Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Virologie
(Direktor: Prof. Dr. P. Naumann)

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON ANTIBIOTIKA UND ANTIKÖRPERN AUF DIE PHAGOZYTOSE VON KLEBSIELLA PNEUMONIAE DURCH ALVEOLARMAKROPHAGEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Christian Undeutsch
1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0145

Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Virologie
(Direktor: Prof.Dr.P.Naumann)

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON ANTIBIOTIKA UND ANTIKÖRPERN AUF DIE PHAGOZYTOSE VON KLEBSIELLA PNEUMONIAE DURCH ALVEOLARMAKROPHAGEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Christian Undeutsch
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez:
Prof.Dr.M.Straßburg

Referent
gez.:
Prof.Dr.H.Brunner

Korreferent
gez.:
Prof.Dr.Dr.P.Pfitzer

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung 5

B. Literaturübersicht 8

C. Material und Methoden 11

I. Gewinnung der Alveolarmakrophagen 11

II. Kultivierung der Alveolarmakrophagen 15

III. Verwendete Bakterien 15

IV. Herstellung von Antiserum 16

a) Phenol/Wasser-Extraktion der Klebsiellen 16

b) Immunisierung von Kaninchen 16

V. Nachweis der Antikörper in den verwendeten Seren 17

a) Röhrchenagglutination

b) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 17

1. Verwendete Puffer 17

2. Antigenbeschichtung der ELISA-Platten ... 18

3. Konjugatherstellung 18

4. Titerbestimmung des Serums 19

VI. Antibiotika 19

a) Gentamicin 19

b) Cephalotin 20

c) Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) 21

VII. Erste Phase der Phagozytose (Untersuchung der Bakterienaufnahme in das Zellinnere) 21

VIII. Zweite Phase der Phagozytose (Untersuchung des intrazellulären Überlebens der Bakterien) 23

D. Ergebnisse 24

I. Charakterisierung der gewonnenen Alveolarmakrophagen 24

II. Antikörpergehalt der verwendeten Seren 26

III. Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen ohne Serumzusatz 26

Seite

IV. Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen in Gegenwart verschiedener Antikörperkonzentrationen.....27

V. Intrazelluläres Überleben der Bakterien in Gegenwart verschiedener Antikörperkonzentrationen.. 28

VI. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration(MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) 31

VII. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Gentamicin- und variablen Antikörperkonzentrationen.....31

VIII. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Cephalotin- und variablen Antikörperkonzentrationen.....33

IX. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Antikörper- und variablen Gentamicinkonzentrationen.....35

X. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Antikörper- und variablen Cephalotinkonzentrationen.....38

E. Diskussion.....41

F. Zusammenfassung.....45

G. Literaturübersicht.....46

Liste der verwendeten Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
BSL	Balancierte Salzlösung
CSF	Colony stimulating factor, Koloniestimulierender Faktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, Enzym-Immuno-Assay
FKS	Fetales Kälberserum
Ig	Immunglobulin
KbE	Koloniebildende Einheiten
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MHK	Minimale Hemmkonzentration
PBS	"Phosphate-Buffered-Saline", phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RES	Retikulo-endotheliales System

A. EINLEITUNG

Die Phagozytose ist einer der bedeutendsten Verteidigungsmechanismen des Organismus gegen eindringende Mikroorganismen. Sie gehört zu den phylogenetisch ältesten Prinzipien der Abwehr (37). Der Begriff Phagozyten wurde 1883 von METSCHNIKOFF* geprägt und bezeichnet die Zellen, die im Organismus eine Freßtätigkeit ausüben und so Gewebstrümmer, Fremdkörper und Mikroben eliminieren (53). Heute unterscheiden wir zwei Kategorien von Zellen, die an diesem Prozeß in besonderem Maße teilnehmen: Mikrophagen (polymorphkernige Leukozyten) und Makrophagen, die im angelsächsischen Schrifttum auch als "mononukleäre Phagozyten" (mononuclear phagocytes) bezeichnet werden (27,71).

Charakteristische Eigenschaften der Makrophagen sind

1. eine gegenüber anderen Zellen zu Gunsten des Plasmas verschobene Kern/Plasma-Relation,
2. die Fähigkeit besonders rasch und reichlich auch größere Teilchen aufzunehmen und verdaubares Material mit Hilfe eigener Enzymsysteme abzubauen und
3. die Bereitschaft an Glasoberflächen zu haften (65).

Im Gegensatz zu polymorphkernigen Leukozyten (Mikrophagen), die im Körper allenfalls einige Tage leben, sind Makrophagen langlebige Zellen. Unter normalen "steady-state"-Bedingungen haben sie eine Lebensspanne in der Größenordnung von Monaten (17,27). Nach heutiger Auffassung sind die Alveolarmakrophagen wie alle Makrophagen monozytären Ursprungs und stammen letztlich aus dem Knochenmark (1,11,38,45,50,65,70). Sie halten sich nach ihrem Austritt aus dem Mark zunächst als Monozyten für Stunden bis Tage im zirkulierenden Blut auf und wandern dann ins Gewebe, d.h. ins Lungeninterstitium (17,65). Hier werden sie, wahrscheinlich über vermehrungsfähige Vorstufen (13,38), zu reifen Alveolarmakrophagen und begeben sich dann in die Lungenbläschen.

Neben den Blutmonozyten und den Peritonealmakrophagen sind die Alveolarmakrophagen heute einer experimentellen in vitro - Untersuchung relativ leicht zugänglich. MYRVIK, LEAKE und FARISS beschrieben 1961 erstmals die Technik der

---

*Ilja Iljiitsch METSCHNIKOFF (1845-1916), Zoologe und Biologe in Odessa und Paris.

Gewinnung von Alveolarmakrophagen durch Lungenspülung beim Kaninchen und legten so den Grundstein zum Studium dieser Zellen. MAXWELL (1964) modifizierte die Technik der Lungenspülung für kleine Laboratoriumstiere. Menschliche Alveolarmakrophagen wurden erstmals 1964 von VOISIN et al. durch Lungenspülung unter Bronchoskopie gewonnen (und nicht -wie in der angelsächsischen Literatur immer wieder angegeben - 1967 durch FINLEY et al.). Eine Vermehrung der gewonnenen Alveolarmakrophagen gelang bisher nur wenigen Autoren (67). Sie erfordert die Anwesenheit eines sog. koloniestimulierenden Faktors (colony stimulating factor - CSF), wie er in entzündlichen Exsudaten oder Embryonalextrakten vorkommt (68). Derart in Vermehrung befindliche kulturell gezüchtete Alveolarmakrophagen zeigen jedoch starke morphologische Veränderungen gegenüber frisch gewonnenen Zellen. Auch in vivo vermehren sich reife Alveolarmakrophagen in der Lunge unter normalen Bedingungen höchstens in sehr kleiner Rate (17). Bei entsprechender äußerer Stimulation (z.B. durch NO_2-Gas) kann es jedoch wieder zu Zellteilungen dieser Makrophagen kommen (38).

Wie von zahlreichen Autoren immer wieder hervorgehoben wurde, spielen Alveolarmakrophagen in der Lunge eine fundamentale Rolle bei der Abwehr schädigender Einflüsse der verschiedensten Art (30,38,79,83). Sie setzen sich mit Staub, Bakterien, Pilzen und Viren auseinander, wenn diese in die Lungenperipherie gelangen (31,32,64). Durch die Phagozytose von Mikroorganismen sichern sie bei gesunden Individuen die Aufrechterhaltung der Sterilität im distalen Respirationstrakt (5) und stellen so die erste Verteidigungslinie gegen eine bakterielle Infektion des Lungengewebes dar (11,12,13, 26,33,82). Darüber hinaus wird den Alveolarmakrophagen bei der Auslösung der Immunantwort des Körpers auf solche inhalierten Antigene, die bis in die Alveolen gelangen können (Teilchengröße < 3-10 µm im Durchmesser), eine wichtige Rolle zugeschrieben (11,39,63). Diese Zellen sind nämlich bei der Beantwortung des Antigenreizes das erste Glied in einer Kette teilweise noch nicht eindeutig geklärter Reaktionen, an deren Ende die Produktion spezifischer Antikörper steht (9,65).

Folgende Mechanismen werden hierbei diskutiert:

1. Eine Schutzfunktion der Alveolarmakrophagen vor übermäßiger Antigenzufuhr (und damit Immunparalyse) durch Aufnahme, Katabolismus und Eliminierung eines großen Teils von immunogenen Molekülen (11,13,65)
2. Gleichzeitig aber auch eine Speicherung eines Teils der aufgenommenen Moleküle, ihre Verarbeitung und Weitergabe an immunkompetente Zellen (11, 28, 39, 43, 77).

Die beschriebene Abwehrfunktion der Alveolarmakrophagen erreicht ihre volle Wirksamkeit jedoch erst im Zusammenwirken mit humoralen Faktoren, insbesondere spezifischen Antikörpern (70). So nehmen Makrophagen, die sich mit verschiedenen Bakterien ihrer Umgebung auseinandersetzen, bevorzugt die auf, die mit Antikörpern besetzt sind (33). Von verschiedenen Mikroorganismen ist bekannt, daß sie nur in Anwesenheit spezifischer humoraler Antikörper wirkungsvoll phagozytiert werden (65). Auch die intrazelluläre Abtötung von Bakterien soll durch Antikörper erleichtert werden (4). Derartige Serumfaktoren mit phagozytosefördernder Wirkung (zu ihnen gehören auch bestimmte Komplementfaktoren) werden nach WRIGHT und DOUGLAS (1903) Opsonine genannt.

Körpereigene Abwehrmechanismen wie Phagozytose und humorale Immunität spielen also bei der Auseinandersetzung des Körpers mit den Bakterien eine bedeutende Rolle. Zusätzlich werden jedoch heute bei nachgewiesenen oder auch nur vermuteten bakteriellen Infektionen Antbiotika üblicherweise großzügig eingesetzt. Es erhebt sich so die Frage, ob Antbiotika die obenbeschriebenen körpereigenen Abwehrmechanismen beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb versucht werden, anhand von in vitro-Experimenten mit Meerschweinchenalveolarmakrophagen eine Antwort darauf zu geben, ob es zu einer Beeinflussung der Phagozytosefunktion durch bestimmte Antibiotika kommt, bei welchen Konzentrationen diese gegebenenfalls auftritt und welche Rolle spezifische Antikörper in diesem Zusammenhang spielen.

B. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

Der Phagozytosebegriff wird in der Literatur nicht ganz einheitlich verwendet. Während manche Autoren darunter nur die aktive Aufnahme der Bakterien in die Zellen verstehen (40, 49), fassen die meisten den Ausdruck Phagozytose als Oberbegriff auf und unterteilen in die Einzelfunktionen:

1. aktive Aufnahme der Bakterien in das Zellinnere (=erste Phase der Phagozytose)
2. intrazelluläre Abtötung und Verdauung (=zweite Phase der Phagozytose)(18, 27, 30, 45, 65).

In der vorliegenden Arbeit wurde die letzte Auffassung des Phagozytosebegriffes als Grundlage genommen.

Einflüsse der verschiedensten Substanzen auf die Phagozytosetätigkeit der Makrophagen wurden bereits untersucht: Äthanol, Levorphanol, Hydrocortison, Phenylbutazon und Zigarettenrauch haben einen negativen Einfluß (49, 57, 71). Oestrogene, Clofazimin (Lampren^{R}) und Emetin scheinen die Phagozytose zu steigern (7, 14, 65). Suramin (Germanin^{R}) hat keinen Einfluß (60). Übersichten finden sich bei BOWDEN (1971) oder HOCKING (1979) (11, 39).

Der Einfluß von Antibiotika auf die Phagozytose hat bisher in der Literatur relativ wenig Beachtung gefunden. Die bis jetzt vorliegenden Untersuchungen wurden z.T. in vivo, z.T. in vitro durchgeführt.

Bei den in vivo-Untersuchungen wurde das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wegschaffung intravenös injizierten partikulären Materials aus dem strömenden Blut (sog. Blutclearance) gemessen. Dies entspricht einer indirekten Prüfung der Aufnahmefunktion von großen Teilen des RES (neuerdings als Monozyten-Phagozyten-System bezeichnet(55)),vor allem der Phagozyten in Leber und Milz (27,65). SEWELL und NICOLL (1958) behandelten Mäuse mit in Klinik und Veterinärmedizin üblichen Dosen verschiedener Antibiotika. Sie stellten keinen Einfluß auf die Blutclearance fest(66). ALTURA et al.(1966) fanden bei Ratten unter Tetrazyklineinfluß einen leichten Rückgang der Clearance (4). ZSCHIESCHE und AUGSTEN (1968) benutzten bei Mäusen sowohl therapeutisch übliche als auch höhere Dosen. Chloramphenicol zeigte bei keiner Dosierung einen Einfluß. Bei Bacitracin, Polymyxin B

und Oxytetracyclin fanden die Autoren vor allem bei höheren Dosen eine Steigerung der Blutclearance kolloidaler Kohle. Wie histologische Untersuchungen zeigten, gingen diese Steigerungen jedoch zum größten Teil auf eine Vermehrung der Anzahl phagozytierender Zellen in Leber und Milz zurück, nicht auf eine Steigerung der Phagozytoseleistung der Einzelzelle (93).Zusammengenommen lassen die in vivo-Experimente keinen sicheren Einfluß der untersuchten Antibiotika auf die Phagozytosetätigkeit der Makrophagen erkennen.

In vivo-Untersuchungen haben den Nachteil, daß nur eine indirekte Einschätzung der Phagozytoseleistung einer nicht genau zu definierenden Makrophagenpopulation möglich ist.

In vitro-Untersuchungen bieten demgegenüber einige Vorteile:

1. Bekannte, homogene Zellpopulationen können benutzt werden.
2. Der Einfluß von Serum und anderen Faktoren auf die Phagozyten kann kontrolliert werden.
3. Die Aufnahme und intrazelluläre Abtötung der Bakterien können unabhängig eingeschätzt werden (27).

Leider lassen sich die von verschiedenen Autoren stammenden in vitro-Experimente nur schwer vergleichen. Es lagen nicht nur unterschiedliche Zellarten, Zellkulturtechniken und Versuchsbedingungen vor, sondern es fanden auch sehr verschiedene Keime Verwendung.

Bei vielen Antibiotika konnte kein Einfluß auf die Phagozytose festgestellt werden (20). Allerdings wurden nur wenige Antibiotika systematisch in mehreren Konzentrationen untersucht.

Bei Mikrophagen gaben die Untersuchungen von DOWNEY und PISANO (1965 und 1966) Hinweise dafür, daß Peptidantibiotika (Bacitracin und Polymyxin B) in 10-20facher minimaler bakterizider Konzentration (MBK)die Bakterienaufnahme in die Zellen hemmen. Bei anderen Antibiotika konnten die Autoren jedoch keinen Einfluß nachweisen (20,21).

Bei Makrophagen wird in einigen Arbeiten über eine Hemmung der Bakterienaufnahme unter Streptomycin in mittleren Konzentrationen berichtet: MORELLO (1965) fand eine Hemmung der Bakterienaufnahme bei 5µg/ml (54), während TEWARI und KUGEL (1971) erst ab 25µg/ml einen Rückgang verzeichneten, der sich mit zunehmender Streptomycin-Konzentration noch verstärkte(75). Auch über den Einfluß von Chloramphenicol liegt eine Untersuchung vor, in der von einer negativen Wirkung auf die Keimaufnahme durch Makrophagen berichtet wird: ØDEGAARD und LAMVIK (1976) fanden ab 5µg/ml eine

Verminderung der Keimaufnahme bei menschlichen Monozyten(57).

Es wird jedoch bei einigen Antibiotika in bestimmten Konzentrationen auch von einer positiven Beeinflussung der Phagozytosefunktion von Makrophagen berichtet: ADAM et al.(1971) verwendeten Peritonealmakrophagen. Sie fanden sowohl eine Steigerung der Bakterienaufnahme als auch eine Erhöhung der Abtötungsrate aufgenommener Keime durch Polymyxin B und Gentamicin in Konzentrationen unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK)(2,3). Bei Amphotericin B konnten LIN et al. (1977)in einer Konzentration von 1µg/ml eine verstärkte Bakterienaufnahme in Peritonealmakrophagen feststellen. Zu einer verstärkten Abtötung der aufgenommenen Bakterien kam es jedoch nur, wenn außerdem noch Lymphozyten zugegen waren (48).

Im Hinblick auf das Thema der vorliegenden Arbeit sind nun die Untersuchungen von Interesse, die sich mit dem Einfluß von Serumfaktoren auf die Phagozytose befassen. Die phagozytosefördernde opsonisierende Wirkung spezifischer Antikörper ist bekannt (44, 70, 90) und wurde auch schon verschiedentlich bei Untersuchungen mit Alveolar- und Peritonealmakrophagen festgestellt (33, 63, 83, 88). Vor allem spezifische Antikörper der IgG-Klasse (IgG_1 und IgG_3) wirken stark opsonisierend (61, 63, 70). Auch bestimmte Komplementfaktoren (insbesondere C_{3b}) besitzen eine - wenn auch geringere - opsonisierende Wirkung (27, 45, 47, 70, 72).

MORELLO (1965) zeigte, daß der Einfluß der beschriebenen Serumfaktoren keineswegs für alle Bakterien gleich groß ist (54). Bakterien mit Kapsel scheinen in besonderem Maße der Opsonisierung zu bedürfen, damit eine wirkungsvolle Phagozytose stattfinden kann, während nicht bekapselte Bakterien häufig auch ohne Antiserum gut phagozytiert werden (28, 54, 65, 70). STOSSEL (1974) berichtete schließlich, daß bei defekter Opsonisierungsfunktion des Serums (z.B. Antikörpermangelsyndrom, Defekt des Komplementsystems) vor allem Infektionen mit bekapselten Bakterien häufig sind (72).

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Gewinnung der Alveolarmakrophagen

Verwendung fand eine in Panmixie gehaltene Meerschweinchenpopulation. Das Durchschnittsgewicht der insgesamt 27 verwendeten Tiere betrug 837 g (±106 g). Die Tiere erhielten eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (Nembutal^{R}) in letaler Überdosis (200 mg/kg, Abb.1).

Abb.1 Versuchstier bei der i.p. Injektion

Nachdem die Versuchstiere eingeschlafen waren, wurde die Trachea unter sterilen Kautelen freigelegt (Abb.2,3) und ihre Wand zwischen zwei Knorpelringen mit einer weitlumigen, sterilen Kanüle durchstoßen. Die Kanüle wurde ein Stück weit vorgeschoben und mit Leinenfaden fixiert (42). (Abb.4)
Es folgte die Spülung der Lunge mit insgesamt 70 ml steril-filtrierter balancierter Salzlösung nach Hanks (Hanks BSL) in 6-7 Einzelportionen (31,51,73,79 , Abb.5). Bei der Sterilfiltration kamen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm zur Anwendung (Falcon). Hanks BSL wurde bei pH 7,4 und 37°C verwendet und hatte folgende Zusammensetzung:

$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	: 185,5 mg	Glukose	: 1000 mg
KCl	: 400 mg	Phenolrot	: 17 mg
KH_2PO_4	: 60 mg	aqua dest.ad	1000 ml
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	: 200 mg		
NaCl	: 8000 mg		
$NaHCO_3$	: 350 mg		

Abb.2 Versuchstier vorbereitet zur Freilegung der Trachea

Abb.3 Freigelegte Trachea

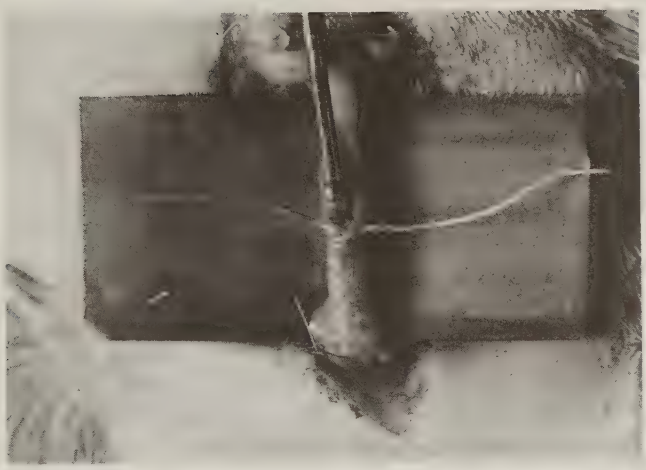

Abb.4 Detailaufnahme der in der Trachea fixierten Kanüle

Abb.5 Lungenspülung

Während der Spülung wurde der Thorax leicht massiert. Unter Berücksichtigung der Hinweise von Stuart et al.(73) wurde darauf geachtet, die Lungen bei der Spülung nicht zu überdehnen, da sonst Blutbeimengungen in der Spülflüssigkeit auftraten. Ungefähr 80 % der in die Lungen instillierten Flüssigkeit konnten ohne Anwendung größeren Unterdruckes wieder abgesaugt werden. Die aspirierten Einzelportionen wurden gemischt, 15 Min. bei 200 x g zentrifugiert, die Sedimente zusammengegossen und in 50 ml steriler Hanks'BSL resuspendiert. Für alle genannten Arbeiten wurden silikonisierte Glasgefäße verwendet. Anschließend wurden die Zellen gezählt und der Prozentsatz lebender Zellen mittels Trypanblau getestet(25,27, 52,61). Hierzu wurden 0,5 ml einer 1/2 %igen Lösung von Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung (Flow Lab.,Bonn) mit 1 ml Zellsuspension gut gemischt und damit nach zwei Min. eine Thoma-Zählkammer gefüllt. Lebende Zellen hatten nun Trypanblau nicht aufgenommen. In tote Zellen war es als Folge von Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran eingedrungen. Der Prozentsatz lebender Zellen errechnete sich aus folgender Formel:

$$\text{Prozentsatz lebender Zellen} = \frac{\text{nicht gefärbte Zellen}}{(\text{gefärbte+nicht gefärbte Zellen})} \times 100$$

Die Zellsuspension wurde anschließend mit steriler Hanks'BSL auf 200 000 Zellen/ml verdünnt. Wurde nun kein Antibiotikum zugesetzt, erwiesen sich die Zellkulturen im weiteren Versuchsablauf trotz konsequentester Einhaltung steriler Kautelen meistens mit Keimen kontaminiert, die offenbar aus dem oberen Respirationstrakt der Tiere stammten (Pneumokokken, Streptokokken).Deshalb wurde für 5 Stunden zu allen Kulturen Streptomycin (Streptomycin-sulfat Heyl^{R}) in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Obwohl von einigen Autoren über eine Phagozytosehemmung durch Streptomycin berichtet wurde (54,75), wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine gute Phagozytoserate beobachtet, wenn man das Streptomycin nur für 5 Stunden im Kulturmedium beließ. Da alle Kulturen dabei gleich behandelt wurden, kann angenommen werden, daß die Aussagekraft der 24 Stunden später durchgeführten vergleichenden Experimente nicht beeinträchtigt wurde .

II. Kultivierung der Alveolarmakrophagen

Sterile Polystyrolröhrchen 16 x 40 mm(Greiner,Nürtingen) wurden mit runden Glasplättchen (13,5 mm Durchmesser) beschickt. In jedes Röhrchen wurden dann 2 ml der obenbeschriebenen Suspension von 200 000 Zellen/ml gefüllt. Die Alveolarmakrophagen konnten sich in den folgenden 5 Stunden bei 37°C auf den Glasplättchen am Boden der Röhrchen festsetzen (13).Danach wurde jedes Röhrchen zweimal mit sterilem Medium 199 (Flow Lab.,Bonn) gespült, um Zellen, die sich nicht festgesetzt hatten, insbesondere Lymphozyten, und das Streptomycin zu entfernen (16,78). Als Kulturmedium wurde nun Medium 199 (pH 7,4) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), je 1,5 ml pro Röhrchen, zugesetzt.(Hitzeinaktivierung des Kälberserums: 30 Min. bei 56°C). Die Kulturen wurden dann bei 37°C inkubiert. Die meisten Röhrchen ließen sich nun ohne weiteren Antibiotikumzusatz bis zu 1 Woche steril halten. Das Medium wurde bei längerfristigen Kulturen nach 2-3 Tagen erneuert. Mikroskopische Kontrollen zeigten, daß ab dem 3.Tag die Zahl der auf dem Glas fixierten Zellen merklich abnahm, da sich eine gewisse Zahl der Makrophagen von der Unterlage ablöste. Die Phagozytoseexperimente wurden deshalb spätestens 48 Stunden nach Zellgewinnung ausgeführt.

III. Verwendete Bakterien

Für die Phagozytoseexperimente mit Alveolarmakrophagen erschien die Verwendung von Bakterien sinnvoll, die typischerweise Lungeninfektionen verursachen (19,46). Es kam deshalb ein Stamm von Klebsiella* pneumoniae zur Anwendung. Klebsiellen sind pathogen für die üblichen Laboratoriumstiere (Mäuse,Meerschweinchen, Kaninchen). Die Maus ist am empfänglichsten, das Kaninchen am wenigsten empfänglich (6,85). Beim Menschen findet man K.pneumoniae bei 10-15 % gesunder Individuen im Respirationstrakt und in den Faeces. Klebsiellen verursachen 3% aller bakteriellen Pneumonien, die prognostisch sehr ungünstig sind ("Friedländer** Pneumonien") (6).

Der verwendete Stamm zeigte im Tuschepräparat nach BURRI eine deutliche Kapsel. Die Resistenzbestimmung mit der Agardiffusionsmethode ergab eine gute Empfindlichkeit für die

---

*Edwin KLEBS (1834-1913): Pathologe und Bakteriologe in Prag, Zürich und Chicago

**Karl FRIEDLÄNDER (1847-1887) Pathologe in Berlin

meisten gängigen Antibiotika (voll sensibel gegenüber Ampicillin, Tetracyclin, Gentamicin, Chloramphenicol, Cephalotin, Cefazolin, Carbenicillin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol).

Es wurde eine Suspension von 8 x 10^6 koloniebildenden Einheiten (KbE)/ ml in Medium 199 hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt und die Suspension bis zu ihrer Verwendung in den Phagozytoseexperimenten bei 4°C aufbewahrt.

IV. Herstellung von Antiserum

a) Phenol/Wasser-Extraktion der Klebsiellen

Es sollte ein vorwiegend gegen Kapselbestandteile der Klebsiellen gerichtetes Antiserum verwendet werden. Deshalb wurde vor der Immunisierung der Kaninchen zunächst eine Phenol/Wasser-Extraktion der Klebsiellen bei 68°C durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, in der wäßrigen Phase weitestgehend proteinfreie Polysaccharide neben Nucleinsäuren zu erhalten (74). WESTPHAL et al. konnten zeigen, daß die so extrahierten Bakterienpolysaccharide für Kaninchen gute Immunogene sind (87).

Auf Müller-Hinton-Agar vermehrte Klebsiellen wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Gleiche Mengen 99%iges Phenol und Klebsiellensuspension wurden auf 68°C erhitzt, zusammengegossen und 5-10 Min. bei 68°C intensiv durchgerührt. Es folgte Abkühlung auf 0°C. Durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 3000 x g und 0°C wurden die Phenolphase mit den Klebsiella-Proteinen und die wäßrige Phase mit den Klebsiella-Polysacchariden und Nucleinsäuren getrennt. Die wäßrige Schicht wurde abpipettiert und zur Entfernung von Phenolspuren 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. In der so gewonnenen Flüssigkeit wurde eine Kohlehydratbestimmung mit Anthron -Reagenz durchgeführt (36). Sie wurde anschließend lyophilisiert.

b) Immunisierung von Kaninchen

Weiße Neuseeland-Kaninchen von ca 4 kg Gewicht wurden mit dem beschriebenen Phenol/Wasser-extrahierten lyophilisierten Klebsiella-Antigen nach folgendem Schema immunisiert:

1. Injektion (intracutan):
   Emulsion aus 0,5 mg Klebsiella-Polysaccarid (in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung) + 1 ml komplettem Freunds Adjuvans (Behring).
2. Injektion (intracutan) nach 3 Wochen:
   Emulsion aus 0,5 mg Klebsiella-Polysaccharid (in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung) + 1 ml inkomplettem Freunds Adjuvans.

3.Injektion (intracutan) nach weiteren 3 Wochen:
Emulsion aus 1 mg Klebsiella-Polysaccharid (in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung)+ 1 ml inkomplettem Freunds Adjuvans

Die 3. Injektion war ursprünglich als intraperitoneale Injektion des reinen Antigens vorgesehen. Da die Tiere jedoch bei der 2.Injektion starke Lokal- und Allgemeinreaktionen zeigten, wurde davon abgesehen.

Die Blutentnahmen erfolgten aus den Marginal-Ohrvenen einmal vor der Immunisierung und durch Herzpunktion eine Woche nach der letzten Injektion. Die gewonnenen Seren wurden sterilfiltriert und in 5 ml- Portionen bis zum Gebrauch bei -20°C tiefgefroren

Das Serum wurde bei einigen Versuchen nach dem Auftauen 30 Min auf 56°C erhitzt (Komplementinaktivierung), um den Einfluß des Komplements zu untersuchen.

V. Nachweis der Antikörper in den verwendeten Seren

Zum Nachweis der Antikörper in den verwendeten Seren dienten Röhrchenagglutination und "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA)

a) Röhrchenagglutination

Halbwertige Verdünnungsstufen des Testserums wurden hergestellt und jeweils mit gleicher Menge Klebsiellensuspension gut gemischt. Darauf wurde 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Titer wurde die höchste Endverdünnung des Serums genommen, die noch zur Agglutination führte (89).

b) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die 1972 von ENGVALL und PERLMANN eingeführte Antikörper-Nachweismethode (23) wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von Antikörpern gegen K.pneumoniae abgewandelt (Abb.6).

1. Verwendete Puffer

Coating Puffer,pH 9,6:

Na_2CO_3 : 1,59 g
$NaHCO_3$: 2,93 g
NaN_3 : 0,2 g
aqua dest. ad 1000 ml
bei 4°C nicht länger als 2 Wochen aufzubewahren

Phosphatpuffersaline-Tween,pH 7,4 (PBS-Tween) :

NaCl : 8,0 g
KH_2PO_4 : 0,2 g
$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$: 2,9 g
KCl : 0,2 g
NaN_3 : 0,2 g

Phosphatpuffersaline-Tween + 0,5 % bovines Serumalbumin, pH 7,4 (PBS-Tween + 0,5 % BSA):

Wie oben, Zusatz von 0,5 % Rinderserumalbumin

Phosphatpuffersaline, pH 7,4 (PBS):

wie oben, jedoch ohne Tween 20

Trispuffer, pH 8,0:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,05 M

Diäthanolaminpuffer, pH 9,8:

Diäthanolamin	:	97,0 ml
aqua dest	:	800 ml
NaN_3	:	0,2 g
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	:	100 mg

pH mit 1 N Salzsäure auf 9,8 einstellen, auf 1000 ml mit aqua dest. auffüllen. Im Dunkeln bei 4°C aufbewahren.

2. Antigenbeschichtung der ELISA-Platten

Das oben beschriebene, Phenol/Wasser -extrahierte, lyophilisierte Klebsiella-Antigen wurde in Coating-Puffer gelöst (30 mg Lyophilisat/100 ml Puffer). Hiermit wurden die Vertiefungen von Mikroelisaplatten (Dynatech, Plochingen) beschichtet, indem man den Puffer eintrocknen ließ. Die Platten wurden dann bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch der Platten mußte überschüssiges, nicht an die Wandungen der Vertiefungen gebundenes Antigen durch dreimaliges Waschen mit Phosphatpuffersaline-Tween (PBS-Tween) entfernt werden.

3. Konjugatherstellung

Die Konjugatherstellung erfolgte entsprechend der bei VOLLER et al. beschriebenen Technik (84): Antiserum gegen Kaninchen-Gamma globulin von der Ziege (Behring) wurde durch Fällungen mit

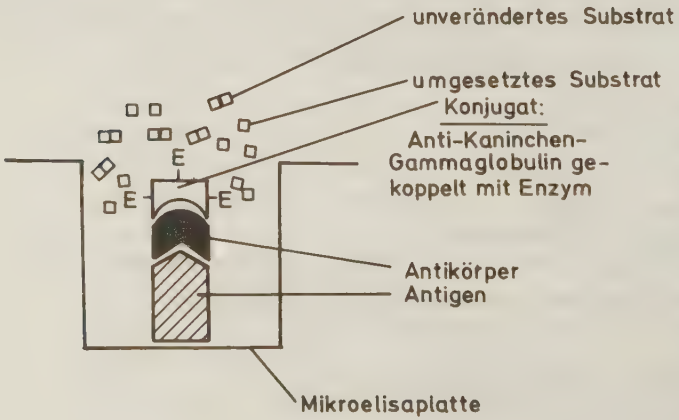

Abb. 6
ELISA-Prinzip, modifiziert nach VOLLER et al.

Na_2SO_4 aufbereitet und das Immunglobulin mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) gekoppelt. Die so hergestellte Konjugat-Stammlösung wurde in einer Gebrauchsverdünnung von 1:500 in PBS-Tween verwendet. Diese Konjugatverdünnung führte noch zu einer optimalen Extinktion nach Substratzugabe.

4. Titerbestimmung des Serums

Die Vertiefungen der beschichteten Mikroelisaplatten wurden mit zweifachen Verdünnungsstufen des Testserums (je 0,2 ml) beschickt. (Verdünnung in PBS-Tween + 0,5 % BSA). Für jede Verdünnungsstufe wurde eine 4 fach-Bestimmung durchgeführt. Als negative Kontrolle (Null-Wert) dienten auf jeder Platte mehrere Vertiefungen, die anstatt mit Serum nur mit Verdünnungspuffer gefüllt, sonst aber völlig gleich behandelt wurden.

Die mit Serumverdünnungen beschickten Platten wurden über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert, anschließend mit PBS-Tween gewaschen, mit Konjugat versehen (je 0,2 ml),wieder über Nacht inkubiert, gewaschen und schließlich mit Substrat gefüllt (je 0,2 ml). Als Substrat diente p-Nitrophenylphosphat (Boehringer Mannheim) in Diäthanolaminpuffer (farblos). Dabei wurde 10 mg Substrat in 10 ml Puffer aufgelöst. Die gebundene alkalische Phosphatase spaltete das Phosphat hydrolytisch ab. Es entstand gelbes p-Nitrophenolat. (Abb 6). Die Extinktion konnte bei 405 nm direkt in der Mikroelisaplatte 30 Minuten nach Substratzugabe mit einem 8 Kanal-Photometer gemessen werden (Titertek Multiskan, Flow.Lab.,Bonn). Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe des Serums angegeben, die gegenüber den Negativkontrollen noch eine signifikante Erhöhung der Extinktion bei 405 nm ergab (t-Test,$p<0,01$)

VI. Antibiotika

Zwei Antibiotika mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf Bakterienaufnahme und intrazelluläres Überleben der aufgenommenen Bakterien untersucht:Gentamicin und Cephalotin.Sie gehören nach DAVIS et al. (1973) zu den bei Klebsiellen-Infektionen häufig gebrauchten Antibiotika (neben Kanamycin,Polymyxin,Chloramphenicol, Streptomycin) (19) .

a) Gentamicin

Verwendung fand Gentamicinsulfat (Refobacin^R).200 mg der verwendeten Substanz entsprachen 120 mg Gentamicin.

Gentamicin gehört zur Reihe der Aminoglykosidantibiotika. Als wasserlösliches Breitbandantibiotikum mit "besonderer klinischer Bedeutung gegenüber gramnegativen Problemkeimen" (WALTER/HEILMEYER,1975) erschien es für die ins Auge gefassten Versuche geeignet. Eine parenterale- und Inhalationstherapie mit Gentamicin wird bei bronchopulmonalen Infektionen durch gramnegative Erreger (Klebsiellen,Pseudomonas,Proteus) empfohlen(86,91).

Gentamicin wirkt auf die Proteinsynthese der Bakterien. Durch Bindung an Ribosomenstrukturen kommt es zu fehlerhafter Lesung des RNA-Code und zur Hemmung der Peptidverknüpfung (86). Die Wirkung ist bei den üblicherweise erreichten Serumkonzentrationen bakterizid (19,29,86,91). Gentamicin ist auch in Lösung überaus stabil. Die Serumeiweißbindung im menschlichen Blut beträgt etwa 30 %. Das Wirkungsoptimum liegt bei pH 7,8 (86).

b) Cephalotin

Die wässrige Lösung von reinem Cephalotin hat einen pH-Wert von 4,5 - 5,0 (86) . In der verwendeten Substanz war deshalb jedes Gramm Cephalotin mit 30 mg Natriumhydrogencarbonat neutralisiert (Cephalotin Lilly Neutral^{R}). 1,056 g der Substanz entsprachen 1 g Cephalotin. Cephalotin aus der Reihe der Cephalosporine ist ein halbsynthetisches, wasserlösliches Breitbandantibiotikum. Die Wirkung erstreckt sich auf grampositive und auf viele gramnegative Keime. Die meisten K.pneumoniae -Stämme gelten als ausreichend gut sensibel gegenüber Cephalotin (29). Bei Septikämien durch gramnegative Erreger (Klebsiella,Pseudomonas, Proteus) kommt auch eine Kombination von Cephalotin und Gentamicin bei der Therapie in Frage (86).

Die Wirkung des Cephalotins beruht auf einer Hemmung der Biosynthese der Bakterienzellwand (19,29,69,86). Die Wirkung ist bei den üblicherweise erreichten Serumkonzentrationen bakterizid. Cephalotin ist nur in trockenem Zustand stabil. In Lösung verliert es rasch an Aktivität. Die hergestellten Lösungen wurden deshalb immer sofort verbraucht. Die Serumeiweißbindung des Cephalotin beträgt im menschlichen Blut ca. 60 %. Das Wirkungsoptimum liegt im schwach sauren Bereich zwischen pH 6,0 und pH 7,3 (86).

Sowohl von Gentamicin als auch von Cephalotin kamen nur Packungen mit gleicher Chargennummer zur Anwendung.

c) Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Für Gentamicin und Cephalotin wurde nach der Röhrchenverdünnungsmethode die MHK und die MBK gegenüber dem verwendeten Klebsiellenstamm bestimmt (29,34,91).

Halbwertige Verdünnungsstufen der Antibiotika in Müller-Hinton-Brühe (pH 7,4) wurden hergestellt und gleiche Volumina einer Suspension von 5 x 10^5 Klebsiellen/ml in Müller-Hinton-Brühe, eingestellt auf pH 7,4, dazugegeben. Es wurde gut gemischt und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Als MHK wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration angesehen, die die Vermehrung der Klebsiellen verhinderte. Zur Bestimmung der MBK wurden aus den Röhrchen, in denen keine Bakterienvermehrung erfolgt war, Subkulturen auf Blutagarplatten angelegt. Die niedrigste Antibiotikumkonzentration, bei der dann keine koloniebildenden Einheiten mehr nachweisbar waren, wurde als MBK angesehen.

VII. Erste Phase der Phagozytose (Untersuchung der Bakterienaufnahme in das Zellinnere)

Die in diesem und im folgenden Kapitel beschriebenen Phagozytoseexperimente wurden in der kurzen Zeitspanne zwischen der 24. und 48. Stunde nach Gewinnung der Zellen durchgeführt. Dies ist insofern von Bedeutung, als einige Autoren über Variationen der Phagozytoserate je nach Alter der Alveolarmakrophagen berichtet haben (16,31).

Die auf Glasoberflächen kultivierten Makrophagen wurden mit 0,5 ml Serumverdünnung, 0,5 ml Klebsiellensuspension und 0,5 ml Antibiotikumverdünnung, jeweils in Medium 199, 60 Min. lang bei 37°C inkubiert. Bei den Kontrollexperimenten wurde jeweils 0,5 ml Medium 199 ohne Zusätze verwendet.

Die Bakterienkonzentration von 8 x 10^6 Klebs./ml entspricht einem Verhältnis von etwa 20 Bakterien pro Makrophagen. Dieser Bakterienüberschuß ist notwendig, da der Kontakt der auf dem Glas sitzenden Makrophagen mit den Bakterien naturgemäß eingeschränkt ist (54) .Zugabe noch größerer Keimzahlen erbrachte keine weitere Steigerung der Bakterienaufnahme. Ein ähnliches Bakterien-Makrophagen-Verhältnis wurde auch von anderen Autoren in vergleichbaren Phagozytoseexperimenten verwendet (31,57, 63,75,78).

Eine Phagozytosezeit von 60 Min. erwies sich als aus-

reichend (siehe Ergebnisteil). Andere Autoren verwendeten bei Phagozytoseexperimenten mit Alveolar- oder Peritonealmakrophagen Phagozytosezeiten zwischen 15 und 120 Min., so daß 60 Min. ungefähr einen Mittelwert darstellen (Tab.1).

Autoren	Verwendete Makrophagen	Verwendete Bakterien	Phagozytosezeit in Minuten
MYRVIK et al. 1961	Alveolarm.	BCG	15
FOX 1973	Alveolarm.	Staph.aureus	45
TEWARI et al. 1971	Peritonealm.	Histoplasma capsulatum	60
LIN et al. 1977	Peritonealm.	L.monocytogenes	60
PESANTI 1978	Peritonealm.	L.monocytogenes, Staph. aureus, Saccharomyces	60
ADAM et al. 1971	Peritonealm.	E.coli	70
MORELLO et al. 1965	Peritonealm.	Salmonella	90
RICHMOND 1974	Alveolarm.	Staph.albus	120

Tab. 1 : Übersicht über die in der Literatur verwendeten Bakterien und Phagozytosezeiten bei einigen Phagozytoseexperimenten mit Alveolar- und Peritonealmakrophagen.

Nach der 60minütigen Inkubation folgte ausgiebige Spülung (6 mal mit je 3 ml Medium 199 pro Röhrchen), um die extrazellulären Bakterien zu entfernen. Anschließend wurde sofort mit einer eiskalten Mischung aus 1 Teil Eisessig und 3 Teilen Methanol fixiert. Dann wurden die Makrophagen nach May-Grünwald -Giemsa (MGG) gefärbt, um Zellen und aufgenommene Bakterien darzustellen (15). Es folgte die mikroskopische Auszählung der aufgenommenen Bakterien pro 100 Makrophagen.

Für eine bestimmte Verdünnung von Serum und Antibiotikum wurden 3-4 Versuche ausgeführt. Auf jedem Glasplättchen wurden je 100 Zellen in der oberen und unteren Hälfte ausgezählt. Die Identität des jeweiligen Präparates war beim Zählen unbekannt.

VIII. Zweite Phase der Phagozytose (Untersuchung des intrazellulären Überlebens der Bakterien)

Die obenbeschriebene mikroskopische Auszählung der intrazellulären Bakterien ergab Aufschlüsse über die Aufnahme der Klebsiellen in die Makrophagen. Wie viele dieser intrazellulären Bakterien nach 60minütiger Phagozytosezeit noch lebten, ließ sich jedoch damit nicht aussagen. Deshalb wurden zusätzlich mit der im folgenden beschriebenen Technik Einflüsse der Antibiotika und der Seren auf das Überleben der aufgenommenen Bakterien bestimmt.

Zunächst wurden die Makrophagen wie oben beschrieben mit Serumverdünnung, Klebsiellensuspension und Antibiotikum-verdünnung bei 37°C inkubiert. Ebenso folgte dann ausgiebige Spülung (6 mal mit je 3 ml Medium 199 je Röhrchen), um alle extrazellulären Bakterien zu entfernen. Am Schluß der letzten Spülung wurde alles Medium 199 abgesaugt. Die Zellen sollten nun zum Zerplatzen gebracht werden, um die intrazellulären Bakterien zu befreien. Hierzu wurde eine sterile 0,01 %ige Rinderserumalbuminlösung von 4°C verwendet (0,1 g bovines Serumalbumin auf 1 Liter aqua dest. steril). Der geringe Zusatz von 0,01 % BSA sollte die Bakterien vor dem bakteriziden Effekt des destillierten Wassers schützen (27). 2 ml dieser sterilen kalten Rinderserumalbuminlösung wurden in jedes Röhrchen gegeben und anschließend mehrfach geschüttelt. Eine mikroskopische Kontrolle ergab, daß die Zellen nach 15- 20 Min. zerplatzt waren.

In den Röhrchen befanden sich nun die aus den Zellen freigesetzten Klebsiellen, suspendiert in Rinderserumalbuminlösung (4°C). Es wurden die darin enthaltenen koloniebildenden Einheiten (KbE) ermittelt. Hierzu wurde die Suspension mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung in 10-fach Stufen verdünnt und von den einzelnen Verdünnungen jeweils 0,1 ml auf Müller-Hinton -Agar ausgestrichen. Nach 24 stündiger Bebrütung bei 37°C wurde auf der Agarplatte, die zwischen 30 und 300 Kolonien enthielt, die Koloniezahl bestimmt und auf die ursprüngliche Suspension umgerechnet.

Für jede Verdünnung von Serum bzw. Antibiotikum wurden 3-4 Versuche ausgeführt. Die Ermittelung der KbE erfolgte jeweils doppelt.

XI. Statistische Berechnungen

Für alle Einzelwerte derselben Versuchsanordnung wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet, Signifikanzberechnungen erfolgten nach Student's t-Test.

D. ERGEBNISSE

I. Charakterisierung der gewonnenen Alveolarmakrophagen

Eine Betrachtung der frisch aus der Meerschweinchenlunge gewonnenen Zellsuspension im Phasenkontrastmikroskop zeigte überwiegend typische Makrophagen (Abb.7): Ovale Form, reichlich, stark granuliertes Zytoplasma mit Vakuolen und zahlreichen Einschlüssen verschiedener Größe, ovaler exzentrisch gelegener Kern (11,38,78).

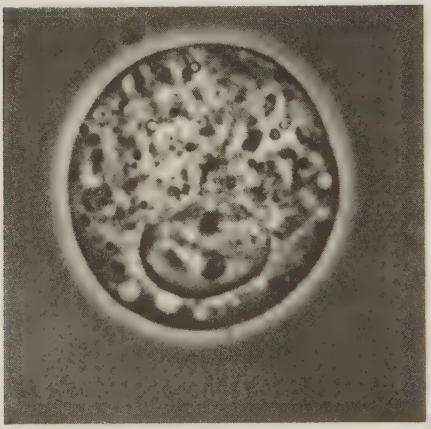

Abb.7: Alveolarmakrophage 3 Stunden nach Spülung der Meerschweinchenlunge. Reichlich granuliertes Zytoplasma mit Vakuolen und Einschlüssen, ovaler exzentrisch gelegener Kern (Phasenkontrast, 2000 x).

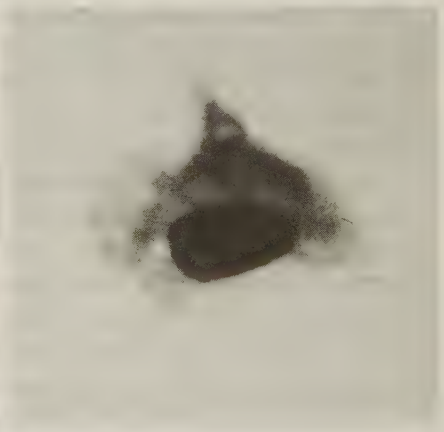

Abb.8: Alveolarmakrophage 4 Tage nach Spülung der Meerschweinchenlunge. Eine Zytoplasmaaustülpung hat sich ausgebildet (May-Grünwald -Giemsa ,1600 x).

Vom 2.Tag an verschwanden Vakuolen und Einschlüsse bei den im Kulturmedium gehaltenen Makrophagen immer mehr. Man fand dann nur noch feinere zytoplasmatische Granulationen. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von VOISIN et al. (1963 und 1964). Im Trypanblautest erwiesen sich unmittelbar nach der Lungenspülung 95-98 % der Zellen als lebend. Nach einer Woche in Kultur lag dieser Prozentsatz noch bei 80 . Nach 48 Stunden in Kultur auf der Glasoberfläche begannen einige der Zellen Zytoplasmaausstülpungen zu zeigen, wie sie bereits von verschiedenen Autoren beschrieben worden sind (Abb.8)(26,31, 56,78,79). Zellteilungen wurden erwartungsgemäß nicht beobachtet (67). Aus einer Meerschweinchenlunge konnten

durchschnittlich 17,2 ± 2,9 x 10^6 Zellen gewonnen werden. Im Ausstrich zeigten sich davon 85 % als Makrophagen, der Rest bestand aus Lymphozyten und einigen polymorphkernigen Leukozyten. Lymphozyten und Leukozyten zeigten jedoch eine geringere Tendenz, sich an Glasoberflächen festzusetzen als Alveolarmakrophagen und wurden somit bei der Spülung nach 5 Stunden aus dem Röhrchen entfernt. Übrig blieb auf der Glasoberfläche eine nahezu reine Makrophagenpopulation (Abb.9,10).

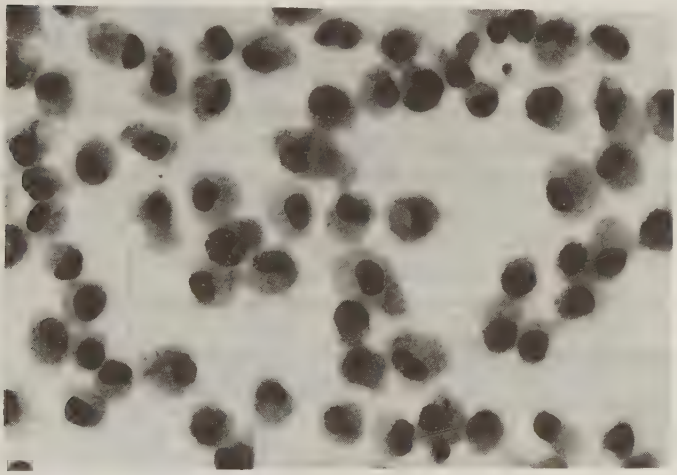

Abb.9 Kultur von Alveolarmakrophagen eines Meerschweinchens 36 Stunden nach der Lungenspülung (May-Grünwald-Giemsa, 500 x).

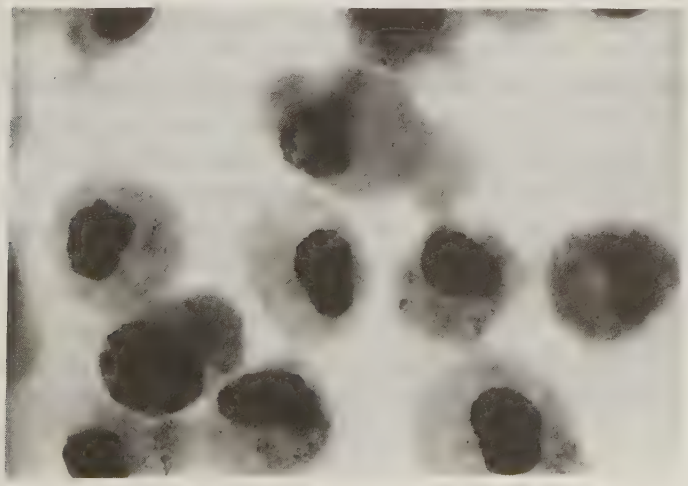

Abb.10 Ausschnittvergrößerung aus Abb.9 (1600 x)

II. Antikörpergehalt der verwendeten Seren

Bei den Phagozytoseexperimenten wurde sowohl Serum nicht immunisierter Kaninchen als auch Serum von gegen K.pneumoniae immunisierten Kaninchen verwendet. Auch die nicht immunisierten Tiere besaßen Serumantikörper gegen K.pneumoniae, die jedoch nur mit der ELISA-Technik, nicht aber mit der Röhrchenagglutination nachweisbar waren. Insgesamt wurden Seren von 25 unbehandelten Kaninchen untersucht (Tab.2). Der ELISA-Titer betrug dabei durchschnittlich 1:249 (niedrigster Titer 1:20, höchster Titer 1:1280). Nach Immunisierung der Kaninchen betrug der mittlere Antikörpertiter in der Röhrchenagglutination 1:320 und in der ELISA-Technik 1:20480. Dies entsprach einer mehr als 60-fach höheren Empfindlichkeit der ELISA-Bestimmung gegenüber der Röhrchenagglutination (Tab.2).

Seren	Antikörpertiter in	
	Röhrchen-agglutination	ELISA
Seren vor Immunisierung	<2	249
Seren nach Immunisierung	320	20480

Tab.2 Antikörpertiter gegen K.pneumoniae bei Kaninchen (reziproke, geometrische Mittelwerte)

III. Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen ohne Serumzusatz

Die Aufnahme der Bakterien in die Zellen war ohne Serumzusatz gering. Eine Staffelung der Phagozytosezeiten ließ jedoch erkennen, daß die Zahl aufgenommener Bakterien mit der Phagozytosezeit anstieg, um nach 30 Minuten mit etwa 14 Bakterien auf je 100 Makrophagen ein Maximum zu erreichen (Abb.11). Dieser Wert änderte sich nach 60,90,120 und 150 Minuten nicht mehr wesentlich.

Für alle folgenden Experimente erschien eine Phagozytosezeit von 60 Minuten ausreichend.

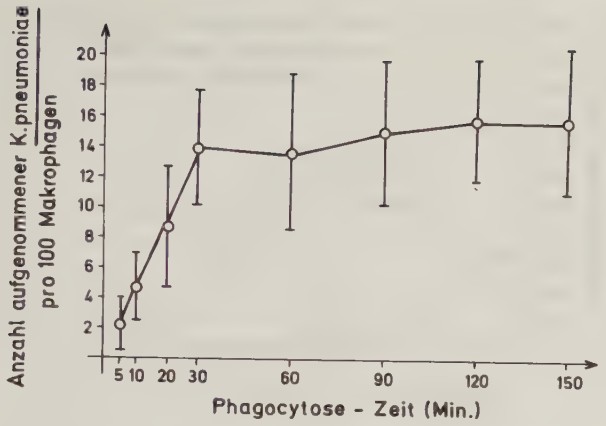

Abb.11 Kinetik der Aufnahme von K.pneumoniae in Alveolarmakrophagen. Das Maximum der Bakterienaufnahme ist bereits nach 30 Min. erreicht (Mittelwerte und Standardabweichungen).

IV. Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen in Gegenwart verschiedener Antikörperkonzentrationen

Die Gegenwart von spezifischem Immunserum steigerte die Aufnahme von K.pneumoniae in die Makrophagen erheblich (Abb. 12). Wenn das Immunserum unverdünnt zugegeben wurde, resultierte im Röhrchen (zusammen mit der Klebsiellensuspension) eine Endverdünnung von 1:3. Die Bakterienaufnahme in die Makrophagen war erwartungsgemäß bei dieser hohen Antiserumkonzentration am stärksten und gegenüber den Experimenten ohne Serumzusatz über 35-fach gesteigert. Mit zunehmender Verdünnung des Antiserums wurde die Opsonisierung geringer, um bei einer Verdünnung von 1:768 wieder den Ausgangswert zu erreichen, der ohne Serum ermittelt wurde.

Auch das Serum nicht immunisierter Kaninchen steigerte die Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen konzentrationsabhängig, jedoch nicht in demselben Ausmaß wie Immunserum (Abb.12). Bei einer Verdünnung von 1:3 kam es hier nur zu einer ca 12-fachen Steigerung. Der Ausgangswert wurde bereits bei einer Serumverdünnung von 1:24 wieder erreicht.

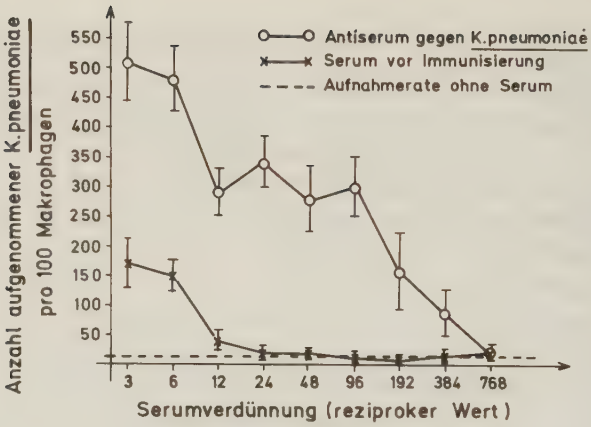

Abb.12 Aufnahme von K.pneumoniae in Alveolarmakrophagen bei variablen Serumverdünnungen. Mit zunehmender Verdünnung des Serums nimmt die Bakterienaufnahme ab (Mittelwerte und Standardabweichungen).

Um eventuelle Einflüsse von Komplementfaktoren abzuschätzen, wurden die oben beschriebenen Untersuchungen mit Seren wiederholt, die vorher 30 Min. auf 56°C erhitzt worden waren. Weder bei Immunserum noch bei Serum nicht immunisierter Kaninchen zeigten sich signifikante Unterschiede gegenüber den Versuchen mit nicht erhitzten Seren.

Die Abbildung 13 zeigt je einen Makrophagen ohne und mit aufgenommenen Bakterien.

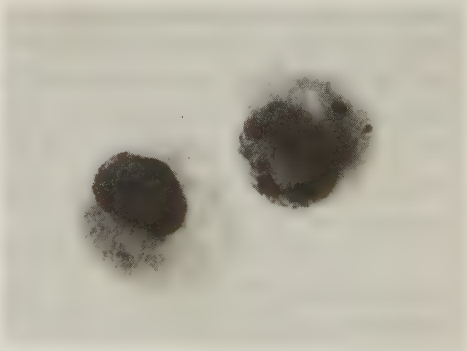

Abb.13 Alveolarmakrophagen, rechts mit aufgenommenen Klebsiellen (May-Grünwald-Giemsa, 1600 x).

V. Intrazelluläres Überleben der Bakterien in Gegenwart verschiedener Antikörperkonzentrationen

Zunächst wurde die Häufigkeit der Spülungen ermittelt, die notwendig war , um alle außen an den Makrophagen haftenden Bakterien zu entfernen. Tab.3 und Abb.14 zeigen, daß bereits

nach 5 Spülungen à 3ml (15 ml) keine extrazellulären Bakterien mehr nachweisbar waren. Sicherheitshalber wurde jedes Röhrchen 6 mal gespült.

	Spülflüssigkeit	K.pneumoniae (KbE je ml Spülflüssigkeit)	s
1.	1.-3. ml	$6{,}35 \times 10^6$	±100 000
2.	4.-6. ml	$0{,}145 \times 10^6$	± 26 000
3.	7.-9. ml	9500	± 4150
4.	10.-12. ml	800	± 110
5.	13.-15. ml	<10	-
6.	16.-18. ml	<10	-
7.	19.-21. ml	<10	-
8.	22.-24. ml	<10	-
9.	25.-27. ml	<10	-
10.	28.-30. ml	<10	-

Tab.3 Koloniebildende Einheiten in der Spülflüssigkeit bei Spülung in 3 ml-Portionen (Mittelwerte und Standardabweichungen)

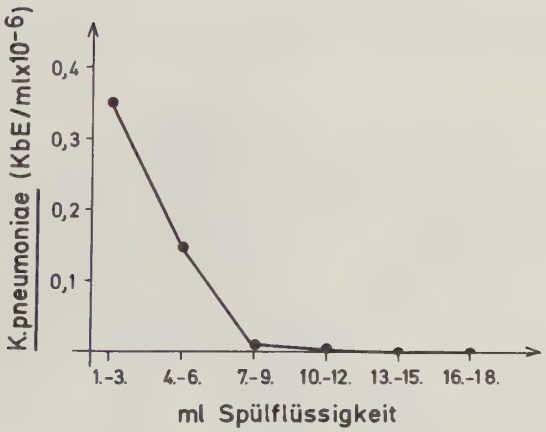

Abb. 14 Koloniebildende Einheiten in der Spülflüssigkeit bei Spülung mit Medium 199 in 3 ml- Portionen. Nach 5 Spülungen sind keine extrazellulären Bakterien mehr nachweisbar.

Nach der Spülung wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären KbE bestimmt. Mit abnehmender Antikörperkonzentration nahm erwartungsgemäß auch die Zahl intrazellulär überlebender Bakterien ab, da die Anwesenheit geringer Antikörperkonzentrationen dazu führte, daß weniger Bakterien in die Zellen aufgenommen wurden (Tab.4,Abb.15). In Abbildung 15 wurden sowohl die Bakterienaufnahme als auch die Zahl intrazellulär überlebender Bakterien bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß beide Werte parallel abnehmen.

Antiserum-verdünnung	K.pneumoniae (intrazelluläre KbE/ml	s
1:3	16 750	± 3304
1:6	17 250	± 3775
1:12	10 000	± 2944
1:24	9750	± 2500
1:48	9250	± 2217
1:96	10 000	± 2582
1:192	5475	± 1422
1:384	3575	± 1443
1:768	400	± 216
1:1536	475	± 150

Tab.4 Intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Antiserumverdünnungen (Mittelwerte und Standardabweichungen).

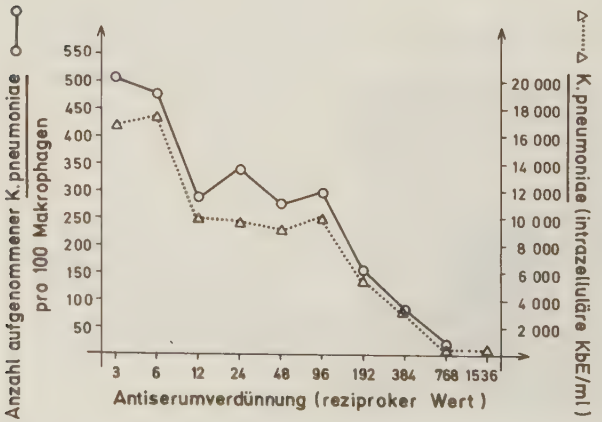

Abb.15 Aufnahme und intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Antiserumverdünnungen.Mit zunehmender Verdünnung des Antiserums nehmen Bakterienaufnahme und intrazelluläres Überleben parallel ab.(Mittelwerte.Auf die Darstellung von Standardabweichungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.Die entsprechenden Werte sind aus Tab.4 bzw.Abb.12 zu entnehmen.)

Ein gesonderter Einfluß des Antiserums auf die intrazelluläre Abtötung der Bakterien ließ sich mit diesen Untersuchungen nicht nachweisen. Die in Abbildung 15 dargestellten Werte dienten als Vergleich für die weiter unten beschriebenen Versuche über den Einfluß von Gentamicin und Cephalotin.

Die Durchführung der beschriebenen Versuche mit hitzeinaktivierten Seren führte zu keiner Veränderung des intrazellulären Überlebens der Bakterien.

VI. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Mit der Röhrchenverdünnungsmethode wurden die in Tab.5 angegebenen Werte für die MHK und die MBK bestimmt, die sich etwa mit den Literaturangaben decken(29,86).

	Gentamicin	Cephalotin
MHK	0,15 µg/ml	6,25 µg/ml
MBK	1,2 µg/ml	*50 µg/ml

Tab.5: MHK— und MBK—Werte von Gentamicin und Cephalotin gegenüber dem verwendeten Stamm von K.pneumoniae . (*unvollständige Bakterizidie bei 25 µg/ml)

Die gefundenen Werte lassen auf eine gute Empfindlichkeit des verwendeten Stammes von K.pneumoniae gegenüber Cephalotin und Gentamicin schließen.

VII. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Gentamicin- und variablen Antikörperkonzentrationen

Die Bakterienaufnahme in die Makrophagen und das intrazelluläre Überleben der aufgenommenen Bakterien wurde bei Anwesenheit von Gentamicin in minimaler bakterizider Konzentration (MBK= 1,2 µg/ml) untersucht. Gentamicin in MBK hatte keinen Einfluß auf die Bakterienaufnahme, ganz gleich in welchem Maße diese durch spezifisches Antiserum gefördert wurde(Abb.16, Tab.6).

Die Zahl intrazellulär überlebender Klebsiellen nahm mit zunehmender Verdünnung des Antiserums ab (Abb.16, Tab.7). Dies galt für Versuche mit und ohne Gentamicin und war auch zu erwarten, da in beiden Fällen auch weniger Bakterien in die

Makrophagen aufgenommen wurden, wenn das Antiserum höher verdünnt war. Die Zahl intrazellulär überlebender Bakterien war jedoch unter Gentamicineinfluß bei jeder der Antiserumkonzentrationen signifikant geringer als ohne Gentamicin ($p < 0,05$). War während der Phagozytose Gentamicin anwesend gewesen, ließen sich jeweils nur etwa ein Drittel der intrazellulären koloniebildenden Einheiten nachweisen im Vergleich zu Versuchen ohne Gentamicin. Mit und ohne Gentamicin in MBK wurden demnach gleich viel Bakterien aufgenommen. Der Prozentsatz abgetöteter Bakterien in den Zellen war jedoch größer, wenn während der einstündigen Phagozytose Gentamicin in MBK anwesend gewesen war.

Antiserumverdünnung	Anzahl aufgenommener Klebs/100 Makrophagen	s
1:3	464,0	±67,8
1:6	500,7	±70,2
1:12	323,2	±47,8
1:24	283,0	±50,8
1:48	277,0	±60,1
1:96	287,2	±49,0
1:192	171,5	±48,1
1:384	95,7	±45,2
1:768	12,8	± 5,7
1:1536	14,0	± 5,9

Tab.6 Aufnahme von K.pneumoniae in die Makrophagen bei variablen Antiserumverdünnungen.Gentamicin in MBK.(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Antiserumverdünnung	K.pneumoniae (intrazelluläre KbE/ml)	s
1:3	5675	±1377
1:6	6175	±1559
1:12	3750	±1207
1:24	3300	±1003
1:48	3250	±1292
1:96	3050	±1290
1:192	1945	± 729
1:384	950	± 300
1:768	100	± 81,7
1:1536	100	± 81,7

Tab.7 Intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Antiserumverdünnungen. Gentamicin in MBK (Mittelwerte und Standardabweichungen)

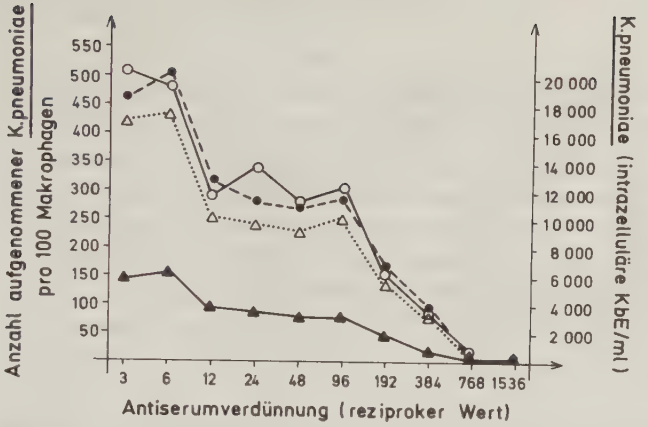

Abb.16 Aufnahme bzw. intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Antiserumverdünnungen.Mittelwerte.Standardabweichungen siehe Tab.4,6,7 bzw. Abb.12)

○——○ Bakterienaufnahme ohne Gentamicin
●– –● Bakterienaufnahme mit Gentamicin
△·····△ intrazelluläre KbE ohne Gentamicin
▲——▲ intrazelluläre KbE mit Gentamicin

VIII. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Cephalotin- und variablen Antikörperkonzentrationen

Die Ergebnisse bei Cephalotin waren vergleichbar denen bei Gentamicin, wenn man die unterschiedlichen Werte für die MBK berücksichtigt, die bei Cephalotin 50 µg/ml betrug (Tab.8,9, Abb.17). Cephalotin in MBK zeigte keinen Einfluß auf die Bakterienaufnahme in die Makrophagen und hatte weniger überlebende Bakterien in den Zellen zur Folge. Im Vergleich zu Experimenten ohne Antibiotikum waren nur 1/3 soviele intrazelluläre koloniebildende Einheiten nachweisbar (Abb.17).

Antiserum-verdünnung	Anzahl aufgenommener Klebs./100 Makrophagen	s
1:3	407,0	±68,1
1:6	400,2	±73,3
1:12	283,8	±58,7
1:24	321,3	±73,0
1:48	289,3	±68,0
1:96	296,8	±72,8
1:192	158,5	±59,2
1:384	81,7	±30,1
1:768	14,8	± 5,8
1:1536	14,7	± 7,5

Tab 8 Aufnahme von K.pneumoniae in die Makrophagen bei variablen Antiserumverdünnungen.Cephalotin in MBK.(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Antiserum-verdünnung	K.pneumoniae (intrazelluläre KbE/ml)	s
1:3	4400	±1071
1:6	4625	±1037
1:12	3175	± 826
1:24	2950	± 896
1:48	3200	±1010
1:96	2750	± 603
1:192	1875	± 532
1:384	825	± 263
1:768	200	± 82
1:1536	75	± 50

Tab.9 Intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Antiserumverdünnungen. Cephalotin in MBK.(Mittelwerte und Standardabweichungen)

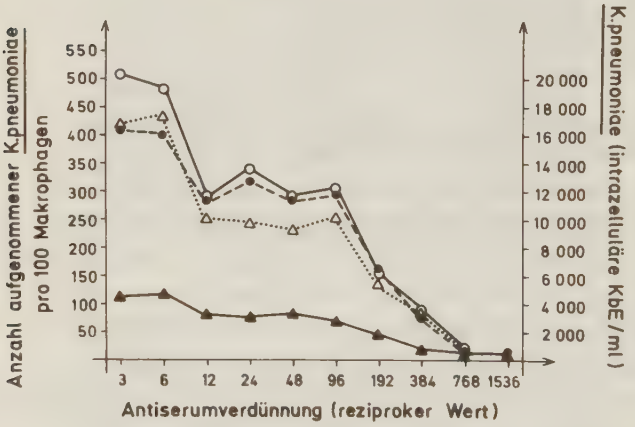

Abb.17 Aufnahme bzw. intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Antiserumverdünnungen. (Mittelwerte. Standardabweichungen siehe Tab.4,8,9 bzw. Abb.12)

- Bakterienaufnahme ohne Cephalotin
- Bakterienaufnahme mit Cephalotin
- intrazelluläre KbE ohne Cephalotin
- intrazelluläre KbE mit Cephalotin

IX. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Antikörper- und variablen Gentamicinkonzentrationen

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluß verschiedener Antibiotikakonzentrationen auf die Phagozytose von K.pneumoniae durch Alveolarmakrophagen untersucht werden. Spezifisches Antiserum wurde dabei durchgehend in einer Verdünnung von 1:6 verwendet. In dieser Verdünnung förderte das Antiserum in hohem Maße die Aufnahme der Klebsiellen in die Makrophagen(Abb.12).

Bei Konzentrationen von Gentamicin bis zur MBK zeigte sich kein Einfluß auf die Bakterienaufnahme durch die Makrophagen(Abb.18,Tab.10). Zu einem signifikanten Rückgang der Aufnahmerate ($p < 0,05$) kam es erst bei einer Gentamicin-Konzentration von 12,8 µg/ml, d.h. etwa der 85-fachen MHK oder der 10-fachen MBK. Bei weiterer Steigerung der Gentamicin-Konzentration bis in den zytotoxischen Bereich hinein, war die Bakterienaufnahme in die Zellen dann noch weiter vermindert (Abb.18,Tab.10). Als zytotoxisch ist diejenige Konzentration definiert, die in einer Suspensionskultur von L-Zellen (mit Serumzusatz) die Zellvermehrung um 50 % reduziert (Für Gentamicin etwa 3000 µg/ml)(58).

Bereits bei einer Gentamicin-Konzentration, die nur 1/3 der MHK betrug (0,05 µg/ml), wurden nach einstündiger Phagozytose signifikant weniger intrazellulär überlebende Bakterien gezählt ($p < 0,05$), als dies ohne Antibiotikum der Fall war (Abb.19,Tab11). Die Übereinanderprojektion der Diagramme für Bakterienaufnahme und intrazelluläres Überleben (Abb.20) zeigt, daß die Abnahme der intrazellulären KbE bei 0,05 µg/ml nicht darauf zurückzuführen war, daß weniger Bakterien aufgenommen wurden. Bei gleicher Bakterienaufnahme kam es also zu einer verstärkten Abtötung der Bakterien, wenn während der Phagozytose 0,05 µg Gentamicin/ml anwesend gewesen war. Wurde die Gentamicin-Konzentration über 0,05 µg/ml hinaus weiter gesteigert, so zeigte sich keine weitere signifikante Abnahme der intrazellulären koloniebildenden Einheiten, selbst bei Konzentrationen, die deutlich über die MHK und MBK hinausgingen.

Gentamicin -Konzentration (µg/ml)	Anzahl aufgenommener Klebs. pro 100 Makrophagen	s
0	397,8	±52,6
0,003	433,3	±53,9
0,013	416,7	±56,2
0,05	417,7	±56,0
0,2	402,0	±49,8
0,8	415,0	±53,0
3,2	368,5	±66,2
12,8	248,8	±49,8
51,2	189,2	±57,3
204,8	171,8	±50,8
819,2	145,3	±50,1
3276,8	124,0	±53,4

Tab.10 Aufnahme von K.pneumoniae in die Makrophagen bei variablen Gentamicin-Konzentrationen. Antiserumverdünnung 1:6. (Mittelwerte und Standardabweichungen)

Gentamicin -Konzentration (µg/ml)	K.pneumoniae (intrazelluläre KbE/ml)	s
0	16 500	±3000
0,003	14 750	±2062
0,013	15 000	±2449
0,05	7200	±1117
0,2	5850	±1008
0,8	5925	±1277
3,2	4950	±1377
12,8	5375	±1047
51,2	2075	± 614
204,8	2700	± 775
819,2	2675	± 764
3276,8	3925	± 539

Tab.11 Intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Gentamicin-Konzentrationen.Antiserumverdünnung 1:6 (Mittelwerte und Standardabweichungen)

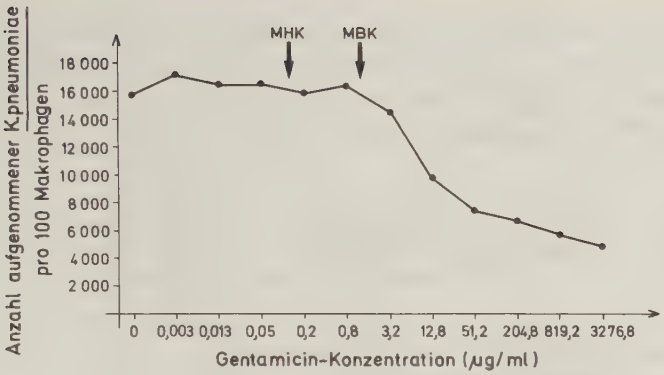

Abb.18 Aufnahme von K.pneumoniae bei variablen Gentamicin-Konzentrationen. Antiserumverdünnung 1:6. (Mittelwerte. Standardabweichungen siehe Tab.10)

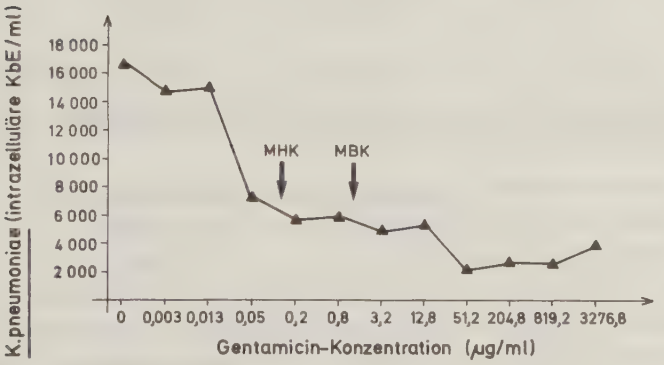

Abb.19 Intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Gentamicin-Konzentrationen.Antiserumverdünnung 1:6. (Mittelwerte.Standardabweichungen siehe Tab.11)

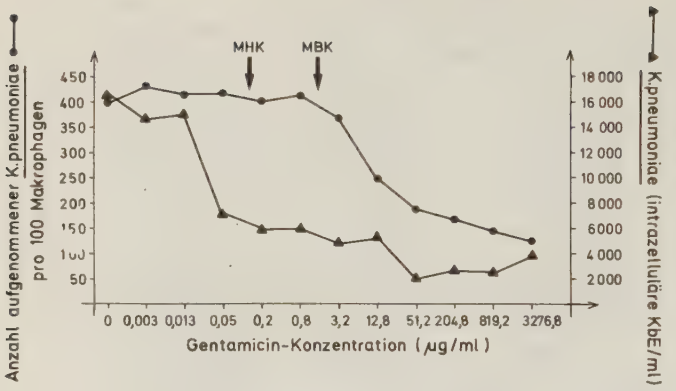

Abb.20 Aufnahme und intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Gentamicin-Konzentrationen.
(Mittelwerte. Standardabweichungen siehe Tab.10 und 11)

X. Phagozytose von K.pneumoniae bei konstanten Antikörper- und variablen Cephalotinkonzentrationen

Ein signifikanter Abfall der Bakterienaufnahme gegenüber den Versuchen ohne Antibiotikum($p < 0,05$) ließ sich erst ab einer Cephalotin-Konzentration von 34133 µg/ml nachweisen (Abb.21, Tab. 12),d.h. ab etwa 5500-facher MHK bzw. 680-facher MBK. Bei Cephalotin trat demnach ein Rückgang der Bakterienaufnahme erst bei erheblich höheren Konzentrationen ein als bei Gentamicin(Tab.14).

Hinsichtlich der Anzahl vermehrungsfähiger Bakterien in den Makrophagen kam es bei Gegenwart von Cephalotin zu ähnlichen Ergebnissen wie bei Gentamicin (Abb.21,Tab.13). Bereits bei 1/3 MHK waren signifikant weniger überlebende Klebsiellen in den Makrophagen nachzuweisen als bei Versuchen ohne Antibiotikum ($p < 0,05$). Wie Abb.21 erkennen läßt, war diese Abnahme der intrazellulären KbE nicht darauf zurückzuführen, daß weniger Bakterien aufgenommen

wurden. Eine Steigerung der Cephalotin-Konzentration über 2,08 µg/ml hinaus führte auch bei sehr hohen Konzentrationen (170-fache MBK) zu keiner weiteren Veringerung der Überlebensrate der Klebsiellen in den Makrophagen .

Cephalotin -Konzentration (µg/ml)	Anzahl aufgenommener Klebs. pro 100 Makrophagen	s
0	388,0	±51,4
0,13	414,2	±58,0
0,52	379,5	±57,3
2,08	392,2	±71,1
8,3	376,7	±71,0
33,3	367,5	±75,9
133	402,3	±60,4
533	369,5	±67,3
2130	340,0	±59,9
8530	384,0	±69,5
34130	223,0	±54,3
136530	188,8	±30,7

Tab.12 Aufnahme von K.pneumoniae in die Makrophagen bei variablen Cephalotin-Konzentrationen. Antiserumverdünnung 1:6. (Mittelwerte und Standardabweichungen)

Cephalotin -Konzentration (µg/ml)	K.pneumoniae (intrazelluläre KbE/ml)	s
0	13 500	±1732
0,13	15 250	±1893
0,52	14 750	±1708
2,08	5876	± 850
8,33	6800	±1319
33,3	4625	±1162
133	5750	±1240
533	6075	±1215
2130	5125	±1135
8530	6800	±1393
34130	2925	± 670
136530	2350	± 580

Tab.13 Intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Cephalotin-Konzentrationen. Antiserumverdünnung 1:6. (Mittelwerte und Standardabweichungen)

Antibiotikum	Rückgang der Bakterienaufnahme ab	
Gentamicin	85 x MHK	10 x MBK
Cephalotin	5500 x MHK	680 x MBK

Tab.14 Konzentrationen von Gentamicin und Cephalotin, von denen ab ein Rückgang der Bakterienaufnahme in die Alveolarmakrophagen zu verzeichnen war (Bezogen auf MHK und MBK).

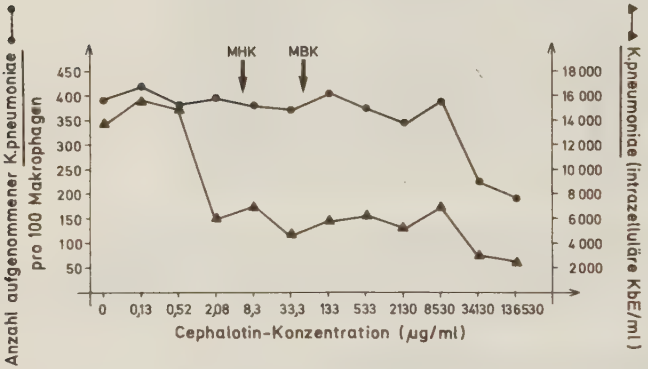

Abb.21 Aufnahme und intrazelluläres Überleben von K.pneumoniae bei variablen Cephalotin-Konzentrationen. Antiserumverdünnung 1:6. (Mittelwerte.Standardabweichungen siehe Tab.12 und 13)

E. DISKUSSION

In Anlehnung an die von Myrvik et al.(1961) erstmals beschriebene Lungenspülung mit nachfolgender Zelltrennung durch Adhärenz an Glasoberflächen ließ sich eine nahezu reine Population von Alveolarmakrophagen gewinnen. Um Einflüsse auf die Phagozytosefunktion der Makrophagen zu untersuchen, erschien es sinnvoll, die Auseinandersetzung dieser Zellen mit K.pneumoniae zu untersuchen . Die hier verwendeten Zellkulturen wurden aus Meerschweinchenlungen gewonnen. Das Meerschweinchen weist ausreichend große anatomische Verhältnisse auf, um eine problemlose Spülung der Lungen zu ermöglichen und erlaubt, genügend Zellen für die umfangreichen Experimente zu gewinnen. Beim Menschen lassen sich durch Spülung einzelner Lungensegmente unter Bronchoskopie zwar auch Alveolarmakrophagen gewinnen, ihre Zahl reicht jedoch für experimentelle in vitro- Untersuchungen größeren Umfanges nicht aus. Bei der Arbeit an der Leiche oder mit operativem Resektionsmaterial können zwar ausreichend Zellen gewonnen werden, diese Zellen sind jedoch nur ausnahmsweise frisch zu gewinnen und das Lungengewebe zeigt oft pathologische Veränderungen (16,76).

Auf die phagozytosefördernde Wirkung spezifischer Antikörper (vor allem IgG_1 und IgG_3) wurde bereits in vielen Arbeiten hingewiesen (16,33,63,65). Die vorliegenden Untersuchungen unterstreichen die große Bedeutung spezifischen Immunserums bei der Aufnahme bekapselter Bakterien in Makrophagen (über 35-fache Steigerung der Bakterienaufnahme). Insbesondere wird die Abhängigkeit der opsonisierenden Wirkung von der Antiserumkonzentration aufgezeigt.

Auch das Serum nicht immunisierter Kaninchen zeigte in den durchgeführten Experimenten eine geringe Förderung der Bakterienaufnahme in die Makrophagen. Dies war wahrscheinlich auf bereits vor der Immunisierung vorhandene Antikörper, die mit einer empfindlichen Methode (ELISA) nachgewiesen werden konnten, zurückzuführen. Eine Entstehung dieser Antikörper durch Immunisierung gegen wirtseigene Darmbakterien wäre naheliegend, jedoch besteht die Darmflora des Kaninchens (wie auch die des Meerschweinchens) überwiegend aus grampositiven Keimen(85). Mithin muß eher eine Immunisierung gegen andere kreuzreagierende Antigene in der Umwelt der Tiere angenommen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete große Steigerung der Bakterienaufnahme durch Kaninchenseren ging nicht auf Komplementeinflüsse zurück. Untersuchungen anderer Autoren sprechen dafür, daß auch in vivo die Opsonisierung durch spezifische Antikörper eine größere Rolle spielt als die Phagozytoseförderung durch Komplementfaktoren (z.B. C_{3b}): Die Lungenspülflüssigkeit des Menschen enthält nur sehr geringe Mengen Komplement, dagegen aber IgG (HOCKING und GOLDE, 1979). RABINOVITCH und DE STEFANO (1973) fanden, daß die Fähigkeit, mit C_{3b}opsonisierte Partikel aufzunehmen, sich bei Makrophagen in vitro bald verliert, während die opsonisierende Wirkung spezifischer Antikörper erhalten bleibt.

Cephalotin oder Gentamicin in minimaler bakterizider Konzentration (MBK) hatten in den vorliegenden Untersuchungen keinen Einfluß auf die opsonisierende Wirkung von spezifischem Antiserum. Erwartungsgemäß kam es zu einer Verminderung intrazellulär überlebender Klebsiellen, wenn Gentamicin oder Cephalotin in MBK anwesend waren. Hierbei kann nicht entschieden werden, ob die Bakterien extrazellulär durch das Antibiotikum oder intrazellulär durch die Makrophagen abgetötet wurden.

Bisher durchgeführte Untersuchungen zum Einfluß von Antibiotika auf den Phagozytosevorgang beschränkten sich meistens auf einige wenige Konzentrationen des Antibiotikums (3,20,48,54,57,66,75). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Gentamicin und Cephalotin in je 12 verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Die Bakterienaufnahme in die Makrophagen wurde nur bei hohen Konzentrationen der untersuchten Antibiotika beeinträchtigt. Auch andere Autoren berichteten bei einigen Antibiotika von einer negativen Wirkung hoher Konzentrationen auf die Phagozytosefunktion (20,21,75). Für Gentamicin und Cephalotin fanden sich jedoch bis heute keine derartigen Hinweise in der mir vorliegenden Literatur.

Eine Hemmung der überaus wichtigen Phagozytosefunktion der Alveolarmakrophagen wäre sicherlich ein unerwünschter Effekt einer antibiotischen Therapie. Es ist jedoch fraglich, inwieweit diese "makrophagentoxische" Wirkung bei hohen Antibiotika -Konzentrationen in vivo von Bedeutung ist. Bei Cephalotin lagen die Konzentrationen, von denen ab ein Rückgang der Bakterienaufnahme beobachtet wurde, so hoch, daß sie bei systemischer

Antibiotikumapplikation beim Menschen auch nicht annähernd erreicht werden können (86). Anders liegen die Verhältnisse bei Gentamicin. Hier wurde ab 12,8 µg/ml ein Rückgang der Bakterienaufnahme verzeichnet. Diese Konzentration kann im menschlichen Serum, insbesondere nach intravenöser Gabe, erreicht, kurzfristig auch überschritten werden. Deutlich überschritten wird sie im Urin, wo 80-100 µg/ml erreicht werden (86). Im Bronchialsekret ist die erreichbare Konzentration jedoch durchweg geringer.

Hinsichtlich des intrazellulären Überlebens der Bakterien ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Gentamicin und Cephalotin feststellen, wenn man die unterschiedlichen Werte für die MHK berücksichtigt. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse führt zu zwei interessanten Gesichtspunkten:

1. Bereits bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen (1/3 MHK bzw. 1/25 MBK) waren nach 60minütiger Phagozytose weniger lebende Bakterien in den Makrophagen nachzuweisen im Vergleich zu Versuchen ohne Antibiotikum. Bei dieser geringen Konzentration der Antibiotika kann es noch nicht zu einer extrazellulären Abtötung der Bakterien gekommen sein. Die Bakterien sind also nicht in abgetötetem Zustand phagozytiert worden. Erst intrazellulär im Zusammenwirken mit den Makrophagen kam es zur Abtötung. Unterschwellige Antibiotikumkonzentrationen führen also offenbar dazu, daß es den Makrophagen gelingt, die aufgenommenen (vielleicht latent geschädigten) Keime in verstärktem Maße abzutöten. Dies unterstützt die Vermutung von Adam et al. (1971), die eine synergistische Wirkung von Antibiotikum und Makrophagen beim Abtöten von Mikroorganismen annehmen (2,3). Derartige Mechanismen würden erklären, weshalb in vielen Fällen bei Serumkonzentrationen, die unter den MHK-Werten liegen, dennoch eine erfolgreiche Therapie möglich ist.

2. Eine Steigerung der Antibiotikakonzentrationen über die MHK und MBK hinaus brachte keine zusätzliche Verstärkung der intrazellulären Abtötung der Bakterien. Viele der aufgenommenen Bakterien überlebten demnach während des Experiments auch sehr hohe extrazelluläre Antibiotikumkonzentrationen. HOLMES et al. berichteten, daß in Makrophagen liegender Staph.aureus 24 Stunden lang vor dem Einfluß von Penicillin und Streptomycin im Kulturmedium geschützt wird (41). BONVENTRE und IMHOFF fanden bei der Inkubation von Peritonealmakrophagen in therapeutischen Streptomycinkonzentrationen nach 4 Stunden keine meßbaren intrazellulären Streptomycinspiegel (10). Es ist denkbar, daß

auch Cephalotin und Gentamicin während des einstündigen Experiments nicht wesentlich in die Zellen eindrangen und so besonders die zu Beginn des Versuches aufgenommenen Bakterien dem weiteren Einfluß des Antibiotikums entzogen wurden.

Insgesamt ließen in den vorliegenden Untersuchungen hohe Antibiotikakonzentrationen (jenseits der MBK) bei der Auseinandersetzung der Alveolarmakrophagen mit den Bakterien nicht unbedingt Vorteile gegenüber mittleren Konzentrationen erkennen. Insbesondere die Anzahl intrazellulär überlebender Keime ließ sich durch hohe Antibiotikakonzentrationen nicht über das Maß hinaus verringern, das schon bei 1/3 MHK erreicht wurde. Voraussetzung war jedoch, daß die Phagozytose durch ausreichende Antikörperkonzentrationen gefördert wurde.

Viele Gründe sprechen dafür, Antibiotika nicht unterdosiert anzuwenden. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch ,daß auch übermäßig hohe Dosierungen -was die körpereigene Abwehr durch die Alveolarmakrophagen angeht- nicht in jeder Hinsicht Vorteile bieten müssen. Vorbehaltlich der Bestätigung der Ergebnisse in weiteren Experimenten und ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen könnte dies im Hinblick auf dosisabhängige Nebenwirkungen der Antibiotika (z.B. Nephrotoxizität bei Cephalotin, Schädigung des Gehörorgans und der Nierenfunktion bei Gentamicin) und auch angesichts ihrer hohen Kosten von Interesse sein.

Die Ergebnisse zeigen, daß Versuche über die Beeinflussung der Phagozytose durch Antibiotika neue Aspekte zur Chemotherapie eröffnen können.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Lungenspülungen bei Meerschweinchen wurden Alveolarmakrophagen gewonnen und auf Glasoberflächen kultiviert. Den Makrophagen wurde zur Phagozytose Klebsiella pneumoniae angeboten.

Spezifisches Kaninchen-Antiserum gegen K.pneumoniae steigerte konzentrationsabhängig die Aufnahmerate der Bakterien in die Makrophagen bis zu 35-fach. Komplementfaktoren waren für die Steigerung der Phagozytoserate durch diese Seren nicht verantwortlich. Seren von nicht immunisierten Kaninchen führten ebenfalls zu einer geringen Steigerung der Phagozytoserate. In diesen Seren konnten mit einer empfindlichen Methode (Enzym-Immuno-Assay) spezifische Antikörper gegen K.pneumoniae nachgewiesen werden.

Gentamicin oder Cephalotin hatten in minimaler bakterizider Konzentration keinen Einfluß auf die durch verschiedene Antiserumkonzentrationen geförderte Aufnahme der Klebsiellen in die Makrophagen. Sie führten in dieser Konzentration erwartungsgemäß zu einer Verringerung der Anzahl intrazellulär überlebender Bakterien. Die Bakterienaufnahme in die Makrophagen wurde nur durch sehr hohe Konzentrationen von Gentamicin oder Cephalotin gehemmt. Die intrazelluläre Abtötung der Bakterien war bereits bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen (ab 1/3 MHK) stärker als ohne Antibiotikum. Höhere Konzentrationen, auch wenn sie beträchtlich über der MHK lagen, ergaben keine zusätzliche Verminderung der Anzahl intrazellulär überlebender Bakterien.

Diese Befunde zeigen, daß sehr hohe Konzentrationen von Gentamicin oder Cephalotin bei der Auseinandersetzung von Makrophagen mit Bakterien nicht unbedingt Vorteile bieten müssen, vorausgesetzt, daß ausreichend Antikörper vorhanden sind.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. ACKERMAN,A.B.
Histologic diagnosis of inflamatory skin diseases.
Lea and Febiger, Philadelphia (1978),p.96-100

2. ADAM,D., MARGET,W.
Die Rolle des Wirts bei der klinischen Wirkung der antibakteriellen Chemotherapie.
Med.Klin.66, 344-351 (1971)

3. ADAM,D., PHILIPP,P., BELOHRADSKY,B.H.
Effect of antibiotics on phagocytosis of mouse-peritoneal-macrophages in vitro.
Aerztl.Forsch.25, 181-184 (1971)

4. ALTURA, B.M., HESHEY,S.G., ALI,M., THAW,C.
Influence of tetracycline on phagocytosis, infection and resistance to experimental shock: relationship to microcirculation.
J.Reticuloendothel.Soc.3, 447-457 (1966)

5. ARNOUX, B., FRITSCH, P., MASSE, R., CHRETIEN, J.
Cinétique des défenses pulmonaires au niveau du poumon profond.
Bull.Eur.Physiopathol.Respir. 13, 83-94 (1977)

6. BADER, R.E.
Klebsiella-Infektionen
in: GRUMBACH-KIKUTH.Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. Hrg.v. GRUMBACH,A., BONIN, O.
Bd. I,2.Aufl., Thieme,Stuttgart (1966)

7. BALÁZS, C., SZABO,M., SZERZE,P., LEÖVEY,A.
Effect of libexin combinatum (libexine and emetine) on phagocytosis by polymorphonuclear granulocytes and alveolar macrophages.
Europ.J.Clin.Pharmacol. 12, 345-348 (1977)

8. BAUER,K.F.
Metodik der Zell- und Gewebezüchtung.
2.Aufl., Hirzel, Stuttgart (1974), S.78-79

9. BISHOP,D.C., GOTTLIEB,A.A.
Macrophages,RNAs and the immune response.
Curr.Top.Microbiol.Immunol.51, 1-26 (1970)

10. BONVENTRE, P.F.,IMHOFF, J.G.
Uptake of ^{3}H-Dihydrostreptomycin by macrophages in culture.
Infect.Immun. 2,89-95 (1970)

11. BOWDEN,D.H.
The alveolar macrophage
Curr.Top.Pathol. 55, 1-36 (1971)

12. BRAIN,J.D.
Free cells in the lungs.Some aspects of their role, quantitation, and regulation.
Arch.Intern.Med. 162, 477-487 (1970)

13. BRAIN,J.D., GOLDE,D.W., GREEN,G.M., MASSARO,D.J., VALBERG, P.A., WARD,P.A., WERB,Z.
Biologic potential of pulmonary macrophages.
Am.Rev.Respir.Dis. 118,435-443 (1978)

14. BRANDT,L., SVENSON,B.
Stimulation of macrophage phagocytosis by clofazimine.
Scand.J.Haematol.10,261-264 (1973)

15. BURCK, H.C.
Histologische Technik.
2.Aufl., Thieme, Stuttgart (1969) ,S.119

16. COHEN, A.B., CLINE,M.J.
The human alveolar macrophage:isolation, cultivation in vitro and studies of morphologic and functional characteristics.
J.Clin.Invest.50, 1390-1398 (1971)

17. COHN, Z.A.
Properties of macrophages.
in: Phagocytic mechanisms in health and disease.
Ed.by WILLIAMS,R.C., FUDENBERG,H.H.
1.Aufl., Thieme, Stuttgart (1972), p.39-49

18. CRITCHLEY,M.
Butterworths Medical Dictionary
2nd ed., Butterworth, London-Boston (1978)

19. DAVIS, P.D., DULBECCO,R., EISEN,H.N., GINSBERG, H.S., WOOD, W.B.
Microbiology, including immunology and molecular genetics.
Harper & Row, New York (1973), p.157-159,770-771

20. DOWNEY, R,J., PISANO,J,C.
Some effects of antimicrobial compounds on phagocytosis in vitro.
J.Reticuloendothel.Soc.2, 75-88 (1965)

21. DOWNEY, R.J., PISANO, J.C.
Effect of Bacitracin on in vitro phagocytosis.
Nature (London) 210, 654-656 (1966)

22. ENGVALL,E., PERLMANN,P.
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Quantitative assay of immunglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874 (1971)

23. ENGVALL,E., PERLMANN,P.
Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA
III.Quantitation of specific antibodies by antigen-coated tubes.
J.Immunol. 109, 129-135 (1972)

24. FINLEY, T.N., SWENSON,E.W., CURRAN, W.S.
Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease.
Ann.Intern.Med.66, 651-658 (1967)

25. FORD,W.L.
Testing the viability of lymphocytes
in:Handbook of experimental Immunology
Ed.by WEIR,D.M.
Vol.2 (Cellular Immunologie)
3ed ed., Blackwell scientific publications,
Oxford (1978) , p.23.10

26. FOX,M.L.
The bovine alveolar macrophage.1.Isolation,
in vitro cultivation, ultrastructure and phagocytosis
Can.J.Microbiol. 19, 1207-1210 (1973)

27. FURTH,R.van, ZWEIT,T.L.van, LEIJH,P.C.J.
In vitro determination of phagocytosis and intra-
cellular killing by polymorphnuclear and mononuclear
phagocytes.
in:Handbook of experimental Immunology .
Ed. by WEIR,D.M.
Vol.2 (Cellular Immunologie)
3ed ed., Blackwell scientific publications,
Oxford (1978) , p.23.1-23.19

28. GANGULY,R., WALDMANN, R.H.
Respiratory tract cell-mediated immunity.
Bull.Eur.Physiopathol.Respir.13,95-102 (1977)

29. GARROD,L.P., LAMBERT,H.P., O'GRADY,F., WATERWORTH,P.M.
Antibiotic and Chemotherapy
Churchill Livingstone, Edinburgh-London (1973)
p. 87-90, 116, 124-129, 508-510

30. GEE,J.B.L.
The alveolar macrophage: pulmonary frontiersman
Am.J.Med.Sciences 360, 195-201 (1970)

31. GERNEZ-RIEUX,C., VOISIN,C., GUILLAUME,J.,WATTEL,F.,AERTS,C.
Recherches sue le rôle du macrophage alvéolaire
en physiopathologie respiratoire.
Lille Méd. 12, 149-158 (1967)

32. GOLDSTEIN,E., LIPPERT,W., WARSHAUER,D.
Pulmonary alveolar macrophage.Defender against
bacterial infection of the lung.
J.Clin.Invest. 54, 519-528 (1974)

33. GOLDSTEIN,E., BARTLEMA,H.C.
Role of the alveolar macrophage in pulmonary
bacterial defense.
Bull.Eur.Physiopathol.Respir. 13, 57-67 (1977)

34. GRIFFITH,L.J.
Bacterial sensitivity testing.
in: GRADWOHL's Clinical laboratory methods and diagnosis
Ed. by FRANKEL,S., REITMAN,S., SONNENWIRTH,A.C.
Vol.2, The C.V.Mosby Company, Saint Louis (1970)

35. HARRIS,J.O., SVENSON,E.W., JOHNSOHN,J.E.
Human alveolar macrophages:comparison of phagocytic
ability, glucose utilisation and ultrustructure
in smokers and non smokers.
J.Clin.Invest. 49, 2086-2096 (1970)

36. HERBERT,D., PHIPPS,P.J., STRANGE,R.E.
Chemical analysis of microbial cells.
V.Carbohydrate analysis
in: Methods in microbiology.
Ed. by NORRIS,J.R., RIBBONS,D.W.
Vol.5B, Academic Press ,London-New York (1971),p.265-272

37. HIRSCH,G.C.
Allgemeine Stoffwechselmorphologie des Cytoplasmas.
in:Handbuch der allgemeinen Pathologie.
Hrg.v. BÜCHNER,F., LETTERER,E., ROULET,F.,
Bd.II/1, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
S. 92-212

38. HOCKING,W.G., GOLDE,D.W.
The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts).
New Engl.J.Med.301, 580-587 (1979)

39. HOCKING,W.G., GOLDE,D.W.
The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts).
New Engl.J.Med. 301,639-645 (1979)

40. HOF,H.
Überlebensmechanismen phagozytierter Keime.
Med.Klin. 74, 470-475 (1979)

41. HOLMES,B., QUIE,P.G., WINDHORST,D.B., POLLARA,B., GOOD,R.A.
Protection of phagocytized bacteria from the
killing action of antibiotics.
Nature (London)210, 1131-1132 (1966)

42. HOLT,P.G.
Alveolar macrophages. I.A simple technique for the
preparation of high numbers of viable alveolar
macrophages from small laboratory animals
J.Immunol.Methods 27,189-198 (1979)

43. HUBER,H., FUDENBERG,H.H.
Die immunologische Funktion von Monozyten
und Makrophagen.
Klin.Wschr.47, 1061-1068 (1968)

44. JENKIN,C., PALME,D.L.
Changes in the titre of serum opsonins and phagocytic
properties of mouse peritoneal macrophages
following injection of endotoxin.
J.Exp.Med. 112, 419-429 (1960)

45. KAPP,J.F.
Phagozytose-ein zentraler Mechanismus der
Entzündungsreaktion.
Klin.Wschr.56, 1039-1047 (1978)

46. KÖHLER,W., MOCHMANN,H.
Grundriß der medizinischen Mikrobiologie
4.Aufl.,Fischer, Jena (1975)

47. LEIJH,P.C.J., BARSELAAR,M.T.van den, FURTH,R.van
Kinetics of phagocytosis and intracellular killing
of candida albicans by human granulocytes and monocytes.
Infect.Immun.17,313-318 (1977)

48. LIN,H.S., MEDOFF,G., KOBAYASHI,G.S.
Effects of Amphotericin B on macrophages and their precursor cells.
Antimicrob.Agents Chemother. 11,154-160 (1977)

49. MARTIN,R.R., WARR,G.A.
Zur Frage der Lungenschäden durch Zigarettenrauchen
Tempo medical 4,18-29 (1979)

50. MASSE,R., FRITSCH,P., NOLIBE,D.,SEDAGHAT,B.
Evaluation quantitative et homéostasie de population des macrophages alvéolaires.
Pathol.Biol.(Paris) 23,464-469 (1975)

51. MAXWELL,K.W., DIETZ,T., MARCUS,S.
An in situ method for harvesting guinea pig alveolar macrophages.
Am.Rev.Respir.Dis.89,579-580 (1964)

52. McLIMANS,W.F., DAVIS,E.V., GLOVER,F.L., RAKE,G.W.
The submerged culture of mammalian cells: the spinner culture.
J.Immunol.79,428-433 (1975)

53. METSCHNIKOFF,E.
Untersuchungen über die intrazelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren.
Arbeiten aus dem zoologischen Institute der Univ.Wien und der Station in Triest.
Bd.V, Alfred Hölder (K.K.Hof- und Universitäts-Buchhändler),Wien (1884),S.141-168

54. MORELLO,J.A., BAKER,E.E.
Interaction of Salmonella with phagocytes in vitro
J.Infect.Dis.115,131-141 (1965)

55. MÜLLER-HERMELINK,H.K., LENNERT,K.
The cytologic, histologic,and functional bases for a modern classification of lymphomas.
in: Malignant lymphomas
Ed.by LENNERT,K.
Springer,Berlin-Heidelberg-New York (1978),p.1-70

56. MYRVIK,Q.N., LEAKE,E.S., FARRIS,B.
Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity.
J.Immunol 86,128-132 (1961)

57. ØDEGAARD,A., LAMVIK,J.
The effect of phenylbutazone and chloramphenicol on phagocytosis of radiolabelled candida albicans by human monocytes cultured in vitro.
Acta path.microbiol.scand. 84,37-44 (1976),Sect.C

58. PAUL,J.
Cell and tissue culture.
4th ed.(reprint)
Churchill Livingstone, Edinburgh-London (1972)
p.135-140

59. PENNINGTON,J.E.
Differential effects of cyclophosphamide and cortisone acetate on bronchoalveolar phagocytic cell populations.
Am.Rev.Respir.Dis.118,319-324 (1978)

60. PESANTI,E.L.
Suramin effects on macrophage phagolysosome formation and antimicrobial activity.
Infect.Immun.20,503-511 (1978)

61. PHILLIPS,H.J.
Dye exclusion tests for cell viability.
in: Tissue culture. Methods and applications.
Ed. by KRUSE,P.F., PATTERSON,M.K.
Academic press, New York (1973)

62. RABINOVITCH,M., DeSTEFANO,M.J.
Particle recognition by cultivated macrophages
J.Immunol.110,695-701 (1973)

63. REYNOLDS,H.J., KAZMIEROWSKY,J.A., NEWBALL,H.H.
Specificity of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of pseudomonas aeruginosa by human alveolar macrophages.
J.Clin.Invest.56,376-385 (1975)

64. RICHMOND,V.L.
In vitro hydrolase and phagocytic activities of alveolar macrophages.
J.Lab.Clin.Meth.83,757-767 (1974)

65. ROOS,B.
Makrophagen: Herkunft,Entwicklung und Funktion.
in: Handbuch der allgemeinen Pathologie.
Hrg.v.ALTMANN,H.W., BÜCHNER,F.,COTTIER,H., GRUNDMANN,E., HOLLE,G., LETTERER,E., MASSHOF,W., MEESEN,H., ROULET,F., SEIFERT,G., SIEBERT,G., STUDER,A.
Bd.VII/3 (Immunreaktionen)
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1970),S.1-128

66. SEWELL,I.A., NICOL,T.
Effect of antibiotics on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system.
Nature (London) 181,1162 (1958)

67. SODERLAND,S.C., NAUM,Y.
Groth of pulmonary alveolar macrophages in vitro.
Nature (London) 245, 150-152 (1973)

68. STANLEY,E.R.
Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor.
Nature(London) 274,168-170 (1978)

69. STEINBRUNN,W., HAEMMERLI,U.P.
Klinische Prüfung von Cephalotin,einem neuen Antibiotikum.
Dtsch.Med.Wschr.91,2003-2007 (1966)

70. STOSSEL,T.P.
Phagocytosis (First of three parts)
New Engl.J.Med. 290,717-723 (1974)

71. STOSSEL,T.P.
Phagocytosis (Second of three parts)
New Engl.J.Med.290,774-780 (1974)

72. STOSSEL,T.P.
Phagocytosis (third of three parts)
New Engl.J.Med.290,833-839 (1974)

73. STUART,A.E., HABERSHAW,J.A.
Cultures of pulmonary macrophages
in: Handbook of experimental Immunology
Ed. by WEIR,D.M.
Vol.2 (cellular Immunology) 3ed ed.
Blackwell scientific publications, Oxford (1978)
p.31.17-31.18

74. SUTHERLAND,I.W., WILKINSON,J.F.
Chemical extraction methods of microbial cells
in: Methods in Microbiolgy
Ed. by NORRIS,J.R., RIBBONS,D.W.
Vol.5B (Polysaccharids)
Academic Press, London-New York (1971),p.363-365

75. TEWARI,R.P., KUGEL,H.L.
Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic
activity of mouse peritoneal macrophages for
histoplasma capsulatum.
Mycopathologica 44,231-240 (1971)

76. TONNEL,A.B., AERTS,C., VOISIN,C.
Utilisation des macrophages alvéolaires humains
en experimentation in vitro: problèmes pratiques.
Rév.Franç.Mal.Resp.2 (suppl.1),5-10 (1974)

77. UNANUE,E.R.
The regulatory role of macrophages in antigenic
stimulation.
Adv.Immunol.15,95-166 (1972)

78. VOISIN,C., GUILLAUME,J., VAN-MOORLEGHEN,C., AERTS,C.
Sélection et mise en survie in vitro des macrophages
alvéolaires de cobaye.
Ann.Inst.Pasteur Lille 14,183-194 (1963)

79. VOISIN,C., MACQUET,V., AERTS,C., GERNEZ-RIEUX,C.
Prélèvement des macrophages alvéolaires par
voie bronchique.
Les Bronches 14,49-54 (1964)

80. VOISIN,C., AERTS,C., TONNEL,A.B., PETITPREZ,A.,PLANCKE,Y.
Le macrophage alvéolaire humain. Technique de
prélèvement et étude du comportement cellulaire
en survie in vitro.
Ann.Inst.Pasteur Lille 22,283-292 (1971)

81. VOISIN,C.,AERTS,C.,TONNEL,A.B.,WATTEL,F.,PETITPREZ,A.,
PLANCKE,Y.
Technique de prélèvement et étude du comportement
"in vitro" du macrophage alvéolaire humain.
Lille Médical 16,701-709 (1971)

82. VOISIN,C., AERTS,C., TONNEL,A.B., HOUDRET,J.L., RAMON,P.
Mise en survie en phase gazeuse et reconstitution in vitro du microenvironnement naturel des macrophages alvéolaires.
Pathol.Biol.(Paris) 23,453-459 (1975)

83. VOISIN,C.
Défenses antibacteriennes du poumon.De l'analyse à la synthèse.
Bull.Eur.Physiopathol.Respir.13,3-7 (1977)

84. VOLLER,A., BIDWELL,D., BARTLETT,A.
Microplate enzyme immunoassay for the immundiagnosis of virus infections.
in: Manual of clinical Immunology
Washington D.C. (1976) p.506-512

85. WAGNER,J.E., MANNING,P.J.
The biology of the guinea pig
Academic Press,New York-San Francisco-London (1976)
p.127-128

86. WALTER,A.M., HEILMEYER,L.,OTTEN,H.,PLEMPEL,M.,SIEGENTHALER,W.
Antibiotika-Fibel
4.Aufl., Thieme,Stuttgart (1975),S.278-295,362-406

87. WESTPHAL,O., LÜDERITZ,O., BISTER,F.
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z.Naturforsch.7b,148-155 (1952)

88. WHITBY,J.L., ROWLEY,D.
The role of macrophages in the elimination of bacteria from the mouse peritoneum.
Brit.J.Exp.Pathol.40,385-370 (1959)

89. WIESMANN,E.
Medizinische Mikrobiologie
4.Aufl.,Thieme,Stuttgart (1978),S.500-502

90. WILLIAMS,R.C.
Opsonins in phagocytosis
in: Phagocytic mechanisms in health and disease
Ed.by WILLIAMS,R.C., FUDENBERG,H.H.
Thieme,Stuttgart (1972), p.167-179

91. WILSON,G.S., MILES,A.
Principles of bacteriology,virology and immunity.
6th ed..,Vol.1
Arnold,London (1972)

92. WRIGHT,A.E.,DOUGLAS,S.R.
Role of the blood fluids in phagocytosis.
Proc.Roy.Soc.B. 72,357-370 (1903)

93. ZSCHIESCHE,W.,AUGSTEN,K.
Experimental studies on the effect of antibiotics and anticancer compounds on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system (RES).
Chemotherapy 13,257-270 (1968)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.H.Brunner
für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen
und die mir jederzeit gewährte Unterstützung .

Frau G.Hohlweck danke ich für ihre Hilfe bei der
Herstellung der Abbildungen.
Weiterhin danke ich Herrn J.Wirtz für seine Unterstützung
bei den Tierversuchen.

Lebenslauf

Am 19. Oktober 1956 wurde ich, Christian Undeutsch, als zweites Kind des Dr. med. Walter Undeutsch und seiner Ehefrau Dr. med. Ursula Undeutsch, geb.Bories, in Dresden geboren. 1957 übersiedelten wir in die Bundesrepublik Deutschland. Hier besuchte ich von 1962-1966 die Grundschule und von 1966-1975 das Freihofgymnasium in Göppingen (Württemberg). Nach dem Abitur begann ich im September 1975 das Studium der Humanmedizin an der Universität Montpellier (Frankreich). Im Juni 1977 beendete ich dort mein vorklinisches Studium erfolgreich mit einer dem Physikum gleichwertigen Prüfung. Seit dem Wintersemester 1977/78 studiere ich an der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf. Hier legte ich am 31. August 1978 den ersten Teil und am 22. August 1980 den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung ab.